

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

**Sinalização química mediando interações  
ecológicas entre a macroalga vermelha  
*Laurencia dendroidea* e seu herbívoro associado  
*Aplysia brasiliensis***

**NATHÁLIA PEIXOTO NOCCHI CARNEIRO**

NITERÓI – RJ

2017

NATHÁLIA PEIXOTO NOCCHI CARNEIRO

**Sinalização química mediando interações ecológicas entre a alga vermelha**

***Laurencia dendroidea* e seu herbívoro associado *Aplysia brasiliiana***

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em  
Dinâmica dos Oceanos e da Terra – Departamento de  
Geologia Marinha, UFF como parte dos requisitos  
necessários à obtenção do título de Doutora em Ciências  
(Ecologia Marinha)

**Orientadores: Dr. Renato Crespo Pereira**

**Dra. Angélica Ribeiro Soares**

NITERÓI

2017

Ficha catalográfica automática - SDC/BIG

C289s Carneiro, Nathália Peixoto Nocchi  
Sinalização química mediando interações ecológicas entre a macroalga vermelha Laurencia dendroidea e seu herbíboro associado Aplysia brasiliiana / Nathália Peixoto Nocchi Carneiro; Renato Crespo Pereira, orientador; Angélica Ribeiro Soares, coorientadora. Niterói, 2017.  
233 f.

Tese (Doutorado) -Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2017.

1. Pista química. 2. Herbívoro-alga. 3. Metabólitos secundários. 4. Defesas químicas induzidas. 5. Produção intelectual. I. Título II. Pereira, Renato Crespo, orientador. III. Soares, Angélica Ribeiro, coorientadora. IV. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Geociências.

CDD -

# NATHÁLIA PEIXOTO NOCCHI CARNEIRO

Sinalização química mediando interações ecológicas entre a alga vermelha *Laurencia dendroidea* e seu herbíboro associado *Aplysia brasiliiana*

Tese submetida ao programa de Pós-Graduação em Dinâmica dos Oceanos e da Terra – Departamento de Geologia Marinha, UFF como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutora em Ciências (Ecologia Marinha)

Aprovada em 20/10/2017

## Banca Examinadora:

Profº. Renato Crespo Pereira, Dr.  
(Orientador)  
UFF

Profº. Angélica Ribeiro Soares, Dr.  
(Orientadora)  
UFRJ - Macaé

Profº. Davyson de Lima Moreira, Dr.  
(Titular)  
(FIOCRUZ)

Profº. Roberto Carlos C. Martins, Dr.  
(Titular)  
(IPPN – UFRJ)

Profª. Daniela Bueno Sudatti, Dr.  
(Titular)  
UFF

Profº. Gilberto Amado Filho, Dr. (Titular)  
UFF/DOT

Profº. Ricardo Coutinho, Dr.  
(Titular)  
UFF/DOT

Profª. Alessandra Leda Valverde, Dr.  
(Suplente)  
UFF

---

Profº. Bernardo Antônio P. da Gama, Dr.  
(Suplente)  
UFF/DOT

## **AGRADECIMENTOS**

Um desafio tão grande quanto escrever esta tese foi resumir em algumas palavras os agradecimentos a tantas pessoas, que ao longo desses anos passaram pelo meu caminho em diferentes fases e espaços, e tornaram a realização deste trabalho possível. Por este motivo, agradeço sincera e profundamente a todos, e saibam que eu poderia escrever outra tese somente para registrar minha gratidão e carinho pelo apoio de cada um; e claro, contar/relembrar todas as histórias que passamos ao longo desses anos.

Primeiramente gostaria de agradecer, de maneira geral, a todos os meus orientadores por terem me oferecido todo o suporte necessário à realização deste trabalho e, acima de tudo, por sempre acreditarem no meu potencial.

Agradeço a Angélica Soares, minha orientadora desde meu primeiro período de graduação; esse casamento já tem quase 12 anos. Agradeço, antes de tudo, a valiosa amizade construída durante todos esses anos de convivência. Obrigada por me apresentar o mundo da ecologia química. Seu entusiasmo por essa belíssima área e pela pesquisa que me despertou o interesse e o prazer de ingressar neste fantástico mundo. Além disso, suas contribuições e críticas, almejando sempre meu crescimento profissional e principalmente pessoal, superaram todas as expectativas de uma orientação. O seu apoio propiciou-me inúmeras oportunidades e aprendizado que aproveitei ao máximo, não tenha dúvidas nisso. Obrigada por tudo que você me ensinou e por acreditar em mim. Se hoje obtive essa conquista, uma das grandes responsáveis foi você. Serei eternamente grata.

Gostaria de agradecer ao meu orientador Renato Crespo por ter aceitado me orientar, pela confiança depositada e o interesse demonstrado ao longo desses anos. Obrigada pela generosa oportunidade de compartilhar comigo todo seu conhecimento, princípios e valores na condução das diversas atividades acadêmicas, com as quais aprendi e amadureci muito. Deixo aqui registrado minha admiração e respeito.

De igual manera mi más sincero agradecimiento al profesor Manuel Norte por aceptar la colaboración entre su grupo (Laboratorio de Productos Naturales Marinos – IUBO – ULL-Tenerife – España) y los grupos de la Profesora Angélica Soares y Renato Crespo, permitiendo el desarrollo de parte del trabajo de esta tesis doctoral. Junto, agradezco mucho a los Profesores José Javier Fernández y María Luisa Souto por el apoyo y confianza en mi trabajo, la capacidad de todos ustedes para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de esta tesis, sino también en mi formación como investigador.

Agradezco, por encima de todo, la disponibilidad y paciencia de todos durante mi estancia en el grupo, durante la cual tuve todo el soporte profesional y logístico para alcanzar los objetivos perseguidos.

Manifesto aqui minha gratidão ao Professor Heitor Duarte, que considero meu co-orientador, por toda contribuição científica na realização deste trabalho. Agradeço a Dra. Daniela Sudatti por todo apoio desde a elaboração deste projeto até a defesa. Vocês tiveram enorme importância nesse trabalho, além de acompanharem e colaborarem em várias etapas desta minha vida acadêmica. Aprendi muito com vocês!

Meus respeitosos agradecimentos pelas inúmeras contribuições da banca de qualificação formada pelos Doutores: Daniela Bueno Sudatti, Alessandra Leda Valverde e Carlos Eduardo Leite Ferreira. E aos membros da banca avaliadora desta tese, Doutores Davyson de Lima Moreira, Roberto Carlos C. Martins, Daniela Bueno Sudatti, Gilberto Amado Filho, Ricardo Coutinho, Alessandra Leda Valverde e Bernardo Antônio P. da Gama, que gentilmente aceitaram o convite de participar dessa fase tão importante da minha vida acadêmica e pela generosa contribuição para consolidação e qualidade deste trabalho.

Estendo meus sinceros agradecimentos a Larêssa da Silva Amaral Martins e Maristela Santos Moreira, secretárias do Programa de Pós-Graduação em Dinâmica dos Oceanos e da Terra (PPG-DOT), da Universidade Federal Fluminense, por sempre disponibilizarem parte dos seus tempos me auxiliando prontamente nas minhas dúvidas e em todas as dificuldades burocráticas relacionadas à pós-graduação durante todo o período do doutorado. Vocês são exemplos de profissionais, agradeço por toda dedicação, gentileza e generosidade desde que ingressei nesta instituição.

Agradeço aos amigos do GPNOA, André Borges, Keila Cavalcante, Juliana Araújo, Jhenifer Nascimento, Karina Godarth, Roberto Sousa e Aline Gomes que contribuíram para o processo de ensino-aprendizagem durante a realização do doutorado e me auxiliaram em diversas atividades ao longo desse tempo, além de terem proporcionado agradáveis companhias e apoio tanto nos momentos bons, quanto nos de dificuldade. Vocês foram essenciais nesta jornada.

Quiero extender un sincero agradecimiento a todos los compñeiros del Laboratorio de Productos Naturales Marinos con que pude compartir experiencias y conocimientos. Gracias al Profesor José Adrián Gavín por la ayuda con el desarrollo de los experimentos de RMN. Mi gratitud a Antônio Hernández Daranas, Ana R. Díaz Marrero, Francisco Cen, Rossana

Gregoria, Olivia Marques, Lina Quispe, Humberto Rodrígues, Adrian Santiago, Azurra Jon, Guillermo Crespín, que han mostrado ser excelentes profesionales de amplia generosidad con sus conocimientos y experiencias. Agradezco de manera especial a Adrián Morales, Caterina Rodríguez e Rosalía González, por la receptividad y gran ayuda desde el primer momento y sobre todo por el surgimiento de una sólida amistad entre nosotros. Con ustedes compatimos conocimientos y experiencias de tipo profesional y personal que fueron y son de gran valor.

Quiero expresar también mi más sincero agradecimiento a compañeros de piso Guillermo Crespín, Djoudi Boukerouis, Mariana Ingold y Irene Lagunes por toda la ayuda que fue esencial durante mi estancia en Tenerife, ustedes son gran amigos que llevaré para siempre conmigo. En general quisiera agradecer a todas y cada una de personas que fueron tan importantes durante ese período lejos de casa e hicieron mi estancia ser inolvidable.

Não posso deixar de agradecer ao João Marcelo Silva pela imprescindível ajuda na coleta de água do mar usada durante os experimentos. Estendo meus agradecimentos a Daiani Campbell por toda a ajuda na manutenção das *Aplysias* no biotério.

Sou grata ao eterno amigo Daniel Simas pelo apoio no desenvolvimento das análises de GC-FID, indispensáveis para conclusão desta tese. E ao Professor Antônio Carlos Ribeiro da Silva por ter disponibilizado as instalações de Cromatografia no Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais para realização das análises de GC-FID.

Não posso deixar de agradecer a Gabriela Calegário que me abrigou tantas vezes em sua casa em Niterói, quando fui fazer a seleção para o doutorado e para cursar disciplinas. E a Nívia Maria Abreu que também, generosamente, me acolheu em sua casa antes da defesa e, sobre tudo, me ajudou em tudo que precisei durante minhas idas a Niterói.

Aos grandes e eternos amigos Hudson Lemos, Evelyn Raposo, Paula Catelani, Rodolfo Coimbra e Natalia Machado que me socorreram sempre que precisei, desde coletas (que muitas vezes não foram bem sucedidas) a simples conversas para distrair ou desabafos e discussões sobre a complexidade da vida e das relações interpessoais. Obrigada pelas experiências e conhecimentos compartilhados.

Agradeço aos amigos Cleyton Moura, Guilherme Barros, Juliana Alves, Paulo Ricardo, Ana de Almeida, Thalisa Cunha, Gabriel Afonso, Christiano Calixto e Marcos Antonio Lopes, que contribuíram (cada um da sua maneira e em seu momento) para a concretização dessa etapa.

Aos colegas do PPG-DOT, em especial a Nívia Maria Abreu, Lais Lima, Marcos Bouças, Géssica Maia, Giselle Gregório, Bernardo Roxo e Rafaela Costa pela convivência e pelo valioso intercâmbio de conhecimento, mesmo que pontuais, durante as disciplinas. Vocês são presentes que o doutorado me deu.

Un agradecimiento especial a Óscar Gómez por escucharme y aconsejarme siempre, por brindarme tu ayuda cuando más la necesitaba, por ser una persona con la que puedo contar siempre, por el cariño y los ánimos que me da y por compartir conmigo muchos momentos tanto alegres como tristes. Gracias siempre. Te quiero.

À minha família, que amo mais que tudo, não há palavras que expressem todo o meu agradecimento pelo suporte incondicional em todos os momentos. A minha mãe, Lucrécia, pela contribuição ética/moral e o caráter ensinados, agradeço por sempre me conduzir pelo caminho da compreensão, diálogo e respeito ao próximo; você é um exemplo de pessoa para todos. A minha irmã, Nayara, e meu cunhado Lucas, pelas inúmeras ajudas para coletar bichos, algas e água do mar, para montar e acompanhar experimentos, muitas vezes durante fins de semanas, feriados e à noite; além de estarem sempre comigo em todos os momentos. E a minha sobrinha Luna, que neste último ano (e alguns meses) chegou para alegrar e dar um “gás” para aguentar a pressão da reta final do doutorado. Sem vocês nada disso seria possível e faria sentido. Amo vocês.

Ao meu pai Aroldo e meus avos Ana Maria e Edmundo, que não mais estão aqui, mas sei que estarão pra sempre do meu lado, em cada momento da minha vida. Amo vocês eternamente.

E finalmente, não posso deixar de agradecer ao povo brasileiro, que por meio dos órgãos de fomento, CAPES, FAPERJ e CNPQ, e pelo programa Ciência sem Fronteira, financiou mais uma pesquisa de doutorado e a quem espero, nos próximos anos, retribuir pelas oportunidades que me foram concedidas junto com as bolsas de estudos que permitiram que eu pudesse me dedicar exclusivamente à pesquisa e realizar o doutorado sanduíche, além de todo o suporte financeiro para a execução deste trabalho.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para este trabalho, registro aqui a minha gratidão. Ninguém faz uma tese sozinho... OBRIGADA A TODOS!!!!

## **RESUMO GERAL**

Os metabólitos secundários são reconhecidos como possíveis mediadores químicos nas interações entre espécies de *Laurencia* e *Aplysia*, mas a identidade e a importância dessas substâncias não foram exploradas. Este estudo buscou avaliar a atuação de pistas químicas envolvidas nas interações ecológicas entre a macroalga vermelha *Laurencia dendroidea* e o seu herbíboro associado, o molusco *Aplysia brasiliiana*. Experimentos em laboratório foram realizados para investigar o reconhecimento e a resposta de *A. brasiliiana* aos metabólitos de *L. dendroidea* exsudados na água do mar; e a resposta de indução de resistências anti-herbivoria e alterações no metabolismo secundário de *L. dendroidea* em respostas ao consumo por *A. brasiliiana* e pistas químicas de alarme transmitidas pela água. A partir de bioensaios de laboratório, análises fitoquímicas, técnicas de química analítica e abordagem metabolômica, foi possível verificar, pela primeira vez, que o sesquiterpeno (+)-elatol, um metabólito produzido por *L. dendroidea* e exsudado para a água do mar, é uma pista química de atração utilizada por *A. brasiliiana*. E que o consumo por *A. brasiliiana*, assim como os sinais químicos advindos de coespecíficos desta macroalga consumidos por este molusco induziram defesa química em *L. dendroidea* de modo rápido, após 48h, acentuando-se após 72h. O aumento na resistência contra a herbivoria foi acompanhado por uma mudança significativa no perfil metabólico de sesquiterpenos em *L. dendroidea*. Este estudo evidenciou, de modo pioneiro, a importância de pistas químicas no estabelecimento da interação *Laurencia-Aplysia* e que esta macroalga produz defesa química induzida por ação direta ou indireta (sinal químico) de herbivoria. Os resultados obtidos nesta tese são evidências inequívocas da importância da sinalização química entre interações alga-consumidor e alga-alga no ambiente marinho.

**Palavras-chave:** pista química, herbivoria, herbíboro-alga, metabólitos secundários, produtos naturais, sesquiterpenos halogenados, (+)-elatol, defesas químicas, defesas induzidas.

## **GENERAL ABSTRACT**

Secondary metabolites are recognized as possible chemical mediators in interactions between species of *Laurencia* and *Aplysia*, but the identity and importance of these substances have not been explored. This study aimed to evaluate the performance of chemical cues involved in the ecological interactions between the red seaweed *Laurentia dendroidea* and its associated herbivore the sea hare *Aplysia brasiliiana*. Laboratory experiments were carried out to investigate the recognition and response of *A. brasiliiana* to metabolites exuded by *L. dendroidea* in seawater; and the anti-herbivory induced resistance and metabolic alterations in *L. dendroidea* in responses to *A. brasiliiana* consumption and chemical water-borne alarm cues. From laboratory bioassays, phytochemistry analysis, analytical chemistry techniques and metabolomic approaches it was possible to verify, for the first time, that the sesquiterpene (+)-elatol, a metabolite produced by *L. dendroidea* and exudate for seawater, is a chemical cue to attract *A. brasiliiana*. And that consumption by *A. brasiliiana* as well as the chemical cues coming from co-specific of this macroalga consumed by this mollusk induced a fast chemical defense production in *L. dendroidea*, after 48h. The increase in resistance against herbivory was accompanied by a significant change in the metabolic profile of sesquiterpenes. This study evidenced in a pioneering way the importance of chemical cues in the establishment of *Laurencia-Aplysia* interaction and that this macroalga produces induced chemical defense by direct herbivory or indirect action (chemical cue). The results obtained in this thesis are unequivocal evidence of the importance of chemical signaling between alga-consumer and alga-alga interactions in the sea.

**Key words:** chemical cues, herbivory, herbivore-alga, secondary metabolites, natural products, halogenated sesquiterpenes, (+)-elatol, chemical defenses, induced chemical defenses.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

<b>Figura I.1.</b> Diagrama dos processos envolvidos na comunicação química entre organismos aquáticos. Adaptado de WEBSTER & WEISSBURG, 2009 .	20
<b>Figura I.2.</b> Esquema adaptado da estrutura da terminologia de infoquímicos proposta por DICKE & SABELIS (1988), destacando o custo/benefício da sinalização para os organismos envolvidos: (+) = resposta favorável e (-) = resposta desfavorável .....	20
<b>Figura I.3.</b> (A): Pluma de odor liberada pelo molusco bivalve <i>Mercenaria mercenaria</i> . (B): Interpretação do vórtices/redemoinhos de turbulência gerado por difusão molecular apartir da região de emissão mais concentrada (esquerda da imagem) dipersando para regiões de menor concentração (direita da imagem) criando “via” de odores. Imagens retiradas de ZIMMER & BUTMAN, 2000 .....	21
<b>Figura I.4.</b> Banco de <i>L. dendroidea</i> na praia Azeda (Armação dos Búzios - RJ). Foto: Nathália Nocchi .....	26
<b>Figura I.5.</b> (A): Visão dorsal de um indivíduo de <i>A. brasiliiana</i> . Foto: Roberto Sousa ...	27
<b>Figura I.6.</b> Reações representativas de oxidação (PETTIT <i>et al.</i> , 1977) e acetilação (DIAS <i>et al.</i> , 2005) realizadas por <i>Aplysia</i> com precursores obtidos a patir da sua dieta com macroalga do gênero <i>Laurencia</i> .....	35

### CAPÍTULO II

<b>Figura II.1.</b> Fracionamento do extrato bruto de <i>L. dendroidea</i> em acetato de etila: metanol (1:1) da Praia Azeda (Búzios-RJ) .....	53
<b>Figura II.2.</b> Fracionamento do extrato bruto de <i>L. dendroidea</i> em etanol:água (1:1) da Praia Azeda (Búzios-RJ) .....	54
<b>Figura II.3.</b> Fracionamento do extrato bruto de <i>L. dendroidea</i> em diclorometano da Praia de Manguinhos (Serra – ES) .....	56
<b>Figura II.4.</b> Espectro de $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 600MHz) da substância <b>1</b> identificada como (+)-elatol. Em vermelho estão destacados os hidrogênios do anel A e em azul os hidrogênios do anel B .....	66
<b>Figura II.5.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 600MHz) da substância <b>1</b> identificada como (+)-elatol .....	66
<b>Figura II.6.</b> Espectro de RMN de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 600MHz) da substância <b>1</b> identificada como (+)-elatol, destacando os assinalamentos de carbono e seus respectivos hidrogênios .....	67

<b>Figura II.7.</b> Estrutura destacando as principais correlações observadas para a substância 1 identificada como (+)-elatol. As linhas destacadas em azul representam as correlações no espectro de RMN de COSY. As setas indicam as correlações no espectro de HMBC, destacando em verde as do C-8; em vermelho as do C-12; em cinza as do C-13; em laranja as do C-1, C-4 e C-6 com o C-6 e em rosa as do C-15 .....	69
<b>Figura II.8.</b> Estrutura da substância 1, identificada como (+)-elatol .....	70
<b>Figura II.9.</b> Espectro de RMN de HSQC (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância 2 identificada como 10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno, destacando os assinalamentos de carbono e seus respectivos hidrogênios .....	72
<b>Figura II.10.</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> )da substância 2 identificada como 10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno .....	73
<b>Figura II.11:</b> Estrutura da substância 2, identificado como 10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno .....	74
<b>Figura II.12.</b> Substância 3, identificada como (Z)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno. E substância 4, identificada como (E)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno .....	75
<b>Figura II.13.</b> Espectro de <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância 3 identificada como (Z)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno .....	76
<b>Figura II.14.</b> Espectro de <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância 4 identificada como (E)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno .....	77
<b>Figura II.15.</b> Comparação dos espectros de RMN de <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) das substâncias 3 e 4. Destacando/ampliando a zona dos hidrogênios das posições 1, 2, 4 e 15 .....	78
<b>Figura II.16.</b> Estrutura da substância 5 identificada como isoobtusol .....	80
<b>Figura II.17.</b> Estrutura da subtância 6 identificada como obtusol .....	81
<b>Figura II.18.</b> Cromatograma de GC/MS da mistura obtida .....	82
<b>Figura II.19.</b> Expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup> C da mistura obtida .....	83
<b>Figura II.20.</b> Estrutura da substância 7 identificada como obtusano .....	84
<b>Figura II.21.</b> Estrutura da substância 8 identificada como nidificeno .....	84

<b>Figura II. 22.</b> Estrutura da substância 9 identificada como 3,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno .....	86
--	----

### **CAPÍTULO III**

<b>Fig 1.</b> Chemical structures of the metabolites found in <i>L. dendroidea</i> .....	103
--	-----

<b>Fig 2. The maze used in this study.</b> The control was in the left aquarium flowing pure seawater and the treatment was in the right aquarium flowing seawater plus a stimuli (e.g. <i>Laurencia</i> tallus or <i>Laurencia</i> -exuded metabolites in seawater extract (SEM). In the intervals between each assay, the entire Y-maze was washed with distilled water and rinsed with seawater and control and stimulus arms of the Y-maze were switched. The seawater flow in each branch of the Y-maze was controlled by flow controllers. Individuals of <i>A. brasiliiana</i> were initially positioned at the base of the Y-maze at the start of each bioassay.....	105
--	-----

<b>Fig 3. GC/MS chromatograms:</b> (A) <i>L. dendroidea</i> extract. (B) <i>Laurencia</i> -exuded metabolites in seawater extract (SEM). (C) Control extract (from artificial seawater). Compounds identified using the GC/MS <i>Laurencia</i> metabolite database: 10-bromo-9-hydroxy-chamigra-2,7(14)-diene ( <b>1</b> ), (+)-elatol ( <b>2</b> ), ( <i>Z</i> )-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene ( <b>3</b> ), ( <i>E</i> )-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene ( <b>4</b> ), isoobtusol ( <b>5</b> ), triquinane ( <b>6</b> ), debromoelatol ( <b>7</b> ) and enone of desbromocartilagineol or laurencenone D ( <b>8</b> ) .....	108
---	-----

<b>Fig 4. Percent responses of <i>A. brasiliiana</i> specimens to different treatments in Y-maze bioassays.</b> Control = artificial seawater without the presence of any <i>L. dendroidea</i> stimuli; LCW = <i>L. dendroidea</i> conditioned water; SEM = <i>Laurencia</i> -exuded metabolites in seawater extract; and ECW = elatol-conditioned water. Asterisks (*) denote significant differences between the response groups according to Chi-square tests ( $p \leq 0.05$ ) ...	109
--	-----

### **CAPITULO IV**

<b>Figure 1.</b> Experimental set-up design of the unidirectional flow-through system used to evaluate induced chemical defense in <i>L. dendroidea</i> . Each specimen of <i>L. dendroidea</i> was divided into four equal pieces (top right of the figure) and exposed concomitantly to different treatments in four experimental units (EU): G, NG, PG and PS, in EU divided into two equal-sized compartments by a PVC mesh. G= grazer, NG= neighbor grazer, PG= presence of grazer and PS= pure seawater. Each EU was
--

replicated 10 times (individuals of *L. dendroidea*). Blue arrows indicate the flow direction of the seawater from the aquarium stock to waste recipient ..... 121

**Figure 2.** Percentage consumption of artificial foods containing extracts of *L. dendroidea* submitted to the bioassay for induction of defenses by *A. brasiliiana*: (A) SIMac (B) ForBuz. Values represent means and standard deviation. Differences were evaluated by Student *t* test for paired samples ( $p < 0.05$ ). C= Control artificial food and T= Treatment artificial food; G= grazer, NG= neighbor grazer, PG= presence of grazer and PS= pure seawater ..... 126

**Figure 3.** Percentage consumption of artificial food containing extract of *L. dendroidea* submitted to 4 treatments (G, NG, PG and PS): (A) SIMac (B) ForBuz. Differences were evaluated by the ANOVA, where distinct letters represent significant differences between the samples ( $p < 0.05$ ). Other legends as in Figure 2 ..... 126

**Figure 4.** GC/MS chemical profile of *L. dendroidea* SIMac (A) and ForBuz (B), highlighting the presence of the sesquiterpenes: elatol (1), (Z)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (2), (E)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (3), rogiolol (4) and obtusol (5) in specimens of each population. Crude extracts analyzed by method I ..... 128

**Figure 5.** Chemical structures of sesquiterpenes from *L. dendroidea* populations (SIMac and FORBuz) used as standards: elatol (1), (Z)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (2), (E)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (3), rogiolol (4) and obtusol (5) ..... 129

**Figure 6.** Metabolomic approach based on CG chemical profile of *L. dendroidea* exposed the experimental procedures G and PS. (A) Scatter plots of the scores of the Principal Component (PC<sub>3</sub> and PC<sub>4</sub>) of the *L. dendroidea* SIMac - 72h. (B) Loading graphs of the PC<sub>3</sub> against the retention time of the compounds of the SIMac samples - 72h. (C) Scatter plots of the scores of the PC<sub>3</sub> and PC<sub>4</sub> of the ForBuz samples of *L. dendroidea* - 48h. (D) Scatter plots of the scores of the PC<sub>1</sub> and PC<sub>2</sub> of the ForBuz samples - 72h. (E) Loading graphs of the PC<sub>3</sub> against the retention time of the compounds of the ForBuz samples - 48h. (F) Loading graphs of the PC<sub>1</sub> against the retention time of the compounds of the ForBuz samples - 72h. When G= grazer, NG= neighbor grazer, PG= presence of grazer and PS= pure seawater ..... 131

**Figure 7.** Metabolomic approach based on chemical profile of *L. dendroidea* exposed the experimental unit NG, PG and PS by CG. (A) Scatter plots of the

scores of the Principal Component PC<sub>3</sub> and PC<sub>4</sub> of the *L. dendroidea* SIMac samples - 72h. **(B)** Loading graphs of the PC<sub>4</sub> against the retention time of the compounds of the SIMac samples- 72h. **(C)** Scatter plots of the scores of the PC<sub>5</sub> and PC<sub>6</sub> of the *L. dendroidea* ForBuz samples - 48h. **(D)** Scatter plots of the scores of the PC<sub>1</sub> and PC<sub>2</sub> of the ForBuz samples - 72h. **(E)** Loading graphs of the PC<sub>5</sub> against the retention time of the compounds of the ForBuz samples - 48h. **(F)** Loading graphs of the PC<sub>1</sub> against the retention time of the compounds of the ForBuz samples - 72h. When G= grazer, NG= neighbor grazer, PG= presence of grazer and PS= pure seawater .....

## LISTA DE TABELAS

**CAPÍTULO II**

<b>TABELA II. 1.</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz, 500 MHz e 300 MHz) para 9 substâncias isoladas ( <b>1 a 9</b> ) .....	60
---	----

<b>TABELA II. 2.</b> Dados de rotação óptica ( $[\alpha]_D$ ) das substâncias isoladas comparados com a literatura .....	65
--	----

**CAPÍTULO III**

<b>Table 1.</b> Retention time ( $r_t$ ); main ions ( $m/z$ ) observed in the mass spectra (EIMS) and detection of sesquiterpenes in the <i>L. dendroidea</i> extract and <i>Laurencia</i> -exuded metabolites in seawater extract (SEM), as characterized by GC/MS analysis. The presence of identified compounds in the samples was marked (x) .....	107
--	-----

**CAPÍTULO IV**

<b>TABLE 1.</b> Comparison of the elatol area units in the experimental units tested in the induction bioassays using <i>L. dendroidea</i> SIMac. Sesquiterpene elatol is the major metabolite in specimens of this population. <b>G</b> = grazing by <i>A. brasiliiana</i> , <b>NG</b> = neighbor grazing, <b>PG</b> = presence of grazer and <b>PS</b> = pure seawater. The ANOVA variance test was used to compare the experimental units at each time analyzed. Student's t-test was used to compare the experimental units individually in the times analyzed ( $\alpha > 0.05$ ). Values represent mean area units by CG/MS analysis, and $\pm$ standard deviation .....	126
--	-----

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO I**

#### **Introdução Geral**

<b>I.1. SINALIZAÇÃO QUÍMICA MEDIANDO RELAÇÕES ECOLÓGICAS: PRINCIPAIS ASPECTOS NA COMUNICAÇÃO ENTRE ORGANISMOS NO AMBIENTE MARINHO .....</b>	18
<b>I.2. RELAÇÃO ECOLÓGICA E QUÍMICA ENTRE OS HERBÍVOROS DO GÊNERO <i>Aplysia</i> E ALGAS VERMELHAS DO GÊNERO <i>Laurencia</i> .....</b>	25
<b>I.2.1. <i>Aplysia</i> spp.: um importante herbíboro marinho.....</b>	27
<b>I.2.2. <i>Laurencia</i> como recurso ecológico para espécies de <i>Aplysia</i> .....</b>	30
<b>I.2.3. Diversidade de metabolitos secundários em <i>Aplysia</i> e <i>Laurencia</i> .....</b>	32
<b>I.3. REFERÊNCIAS .....</b>	35

### **HIPÓTESE E OBJETIVOS**

Hipótese .....	42
Objetivo geral e específicos .....	43

### **CAPÍTULO II**

#### **Isolamento e caracterização de metabólitos secundários de *Laurencia dendroidea***

<b>II. 1. INTRODUÇÃO .....</b>	44
<b>II. 2. PARTE EXPERIMENTAL</b>	
<b>II.2.1. Coleta dos organismos .....</b>	48
<b>II.2.2. Procedimentos gerais .....</b>	49
<b>II.2.3. Extração .....</b>	50
<b>II.2.4. Isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos secundários .....</b>	51
<b>II. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	57
<i>Substância 1: (+)-elatol .....</i>	58
<i>Substância 2 : 10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno .....</i>	71
<i>Substância 3: (Z)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),</i>	

7(14)-trieno .....	74
<i>Substância 4: (E)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),</i>	
7(14)-trieno .....	74
<i>Substância 5: isoobtusol .....</i>	78
<i>Substância 6: obtusol .....</i>	80
<i>Mistura: obtusano (7) + nidificeno (8) .....</i>	82
<i>Substância 9: 3,10-dibromo-4-cloro-<math>\alpha</math>-chamigreno .....</i>	85
Dados físicos das substâncias isoladas .....	87
<b>II. 4. REFERÊNCIAS .....</b>	88

### **CAPÍTULO III**

#### **Detection of a chemical cue from the host seaweed *Laurencia dendroidea* by the associated mollusc *Aplysia brasiliiana***

ABSTRACT .....	100
INTRODUCTION .....	100
<b>MATERIALS AND METHODS</b>	
Collection of organisms .....	101
<i>Laurencia</i> -conditioned seawater (LCW) and <i>Laurencia</i> -exuded	
metabolites in seawater extract (SEM) .....	102
Chemical extraction and identification of secondary metabolites .....	102
GC/MS analysis .....	103
Y-maze experiments .....	104
<b>RESULTS</b>	
GC/MS database of metabolites of <i>Laurencia dendroidea</i> .....	106
Identification of metabolites in extracts of <i>Laurencia dendroidea</i>	
by GC/MS analysis .....	107
Y-maze bioassays .....	107
DISCUSSION .....	107
REFERENCES .....	111

**CAPÍTULO IV****Induce chemical defenses in the red alga *Laurencia dendroidea* by waterborne cues**

ABSTRACT .....	115
INTRODUCTION .....	116
METODOLOGY	
Sampling sites and organisms .....	118
Induced chemical defense bioassays .....	119
Chemical extraction .....	121
Palatability assays .....	122
Chemical profile analysis and metabolomic studies .....	123
RESULTS	
Palatability assay .....	125
Chromatographic chemical profiles and metabolomic studies	
Chemical profile of <i>Laurencia dendroidea</i> .....	127
Effect of grazing on metabolites of <i>L. dendroidea</i> .....	129
Effect of neighbor grazing (waterborne cues) and presence grazer.....	132
DISCUSSION .....	134
REFERENCES .....	139

**CAPÍTULO V**

CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	144
----------------------------	-----

APÊNDICE .....	147
----------------	-----

ANEXO .....	200
-------------	-----



Foto: Nathália Nocchi



Foto: Nathália Nocchi

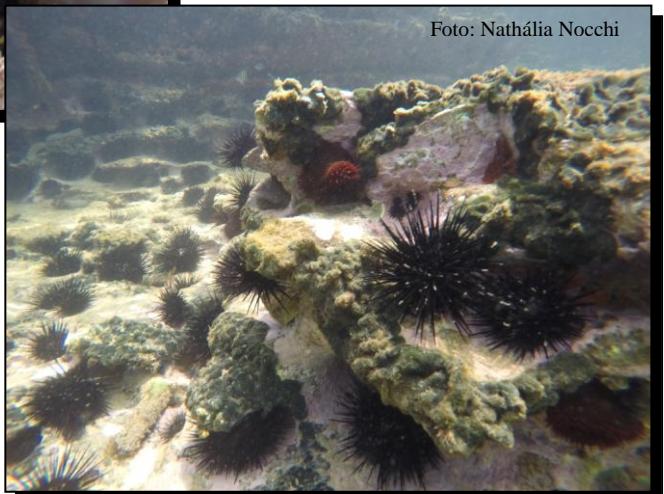


Foto: Nathália Nocchi

# CAPÍTULO I

---

## Introdução Geral

## INTRODUÇÃO GERAL

### I.1. SINALIZAÇÃO QUÍMICA MEDIANDO RELAÇÕES ECOLÓGICAS: PRINCIPAIS ASPECTOS NA COMUNICAÇÃO ENTRE ORGANISMOS NO AMBIENTE MARINHO

A primeira forma de interação entre organismos foi realizada, provavelmente, por transferência de informação química, sendo ela essencial tanto para as formas de vida mais simples quanto para os mais complexos organismos multicelulares (LINDSEY & LASKER, 1974). É difícil para os seres humanos, sendo tão visualmente orientados, apreciar a importância fundamental da sensibilidade química à vida. A capacidade de detectar e responder de forma adaptativa as informações químicas serve como janela primária para o mundo sensorial para a maioria das espécies (ACHE & YOUNG, 2005).

Todos os organismos, vivos ou mortos, liberam produtos químicos que podem ser utilizados como infoquímicos por qualquer outro indivíduo que tenha a maquinaria biológica para detectar e processar essas informações (VOS *et al.*, 2006). Essas substâncias, que podem ser percebidas em baixíssimas concentrações, têm um papel importante no ajuste comportamental e fisiológico dos organismos receptores em todo o espectro taxonômico desde plantas, fungos, bactérias, invertebrados e vertebrados (ATEMA, 1995). O ambiente marinho contém uma matriz dinâmica espacial e temporal de substâncias químicas dissolvidas na água, e do ponto de vista biológico" o mar é de fato um rico caldo de potenciais estímulos químicos". Embora o "odor" seja tipicamente associado ao ar, as pistas químicas transmitidas pela água são essenciais na mediação das interações entre os organismos marinhos, mas os mecanismos envolvidos nesta sinalização ainda não foram totalmente descritos e compreendidos (HAY, 2009). Na verdade, a tentativa de compreensão das substâncias e dos mecanismos que medeiam vários processos da história de vida dos organismos marinhos é um tema recente e em desenvolvimento dentro da ecologia química marinha (ZIMMER & BUTMAN, 2000; HAY, 2014).

A ecologia química marinha compreende o estudo da produção e interação de moléculas bioativas que afetam o comportamento e a função do organismo. Como uma ciência integrativa, a ecologia química marinha tem sido fundamental para a compreensão de mecanismos importantes subjacentes ao funcionamento do ecossistema. Há um crescente

reconhecimento do papel central que a ecologia química desempenha na manutenção da estrutura, função e equilíbrio dos ecossistemas. Em um cenário no qual esses estímulos químicos fossem removidos, se observaria uma cascata de interrupção de interações inter- e intra-específicas nos níveis individual, populacional e de comunidade. Portanto, as investigações no âmbito da ecologia química marinha geram importantes constatações sobre as forças que impulsionam a ecologia e a evolução dos sistemas marinhos (IANORA *et al.*, 2011).

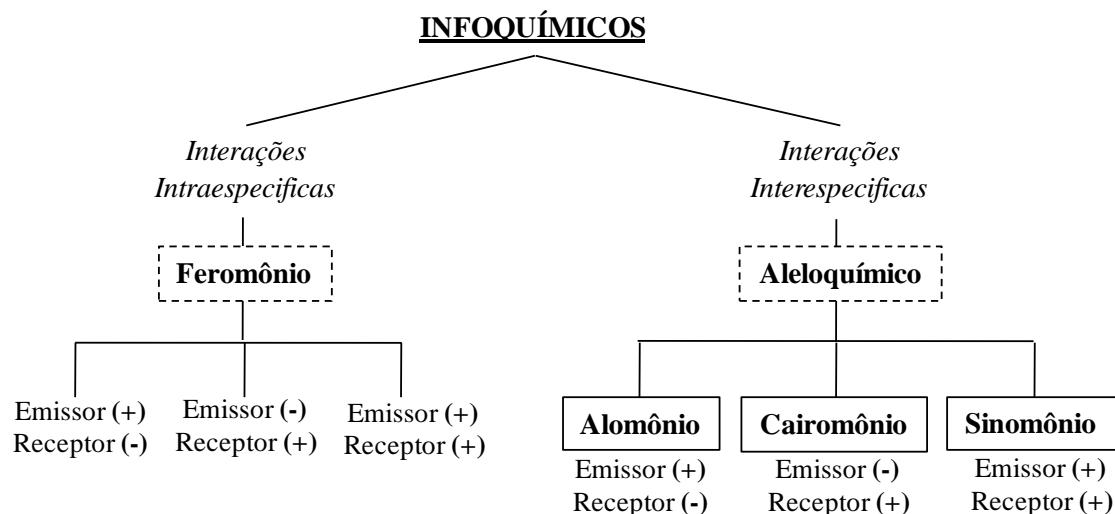
As informações químicas constituem grande parte da linguagem da vida no mar, e nos últimos anos as investigações de como elas medeiam as interações bióticas proporcionaram informações valiosas sobre as forças que moldam a estrutura das comunidades marinhas. Para a maioria das espécies marinhas, a sinalização química determina estratégias de forrageamento, busca de alimento, respostas apropriadas a potenciais predadores, associações comensais, seleção de companheiros e habitats, interações competitivas, hierarquias de dominância e transferência de energia e nutrientes dentro e entre os ecossistemas (HAY, 2009). A informação química é onipresente e provém de fontes abióticas e bióticas intra- e interespecífica (WISENDEN, 2015a). E a natureza molecular dessa informação química, distribuição no ambiente e o mecanismo de recepção determinam a resposta comportamental, fisiológica e ecológica (WEISSBURG *et al.*, 2002).

A comunicação é o processo de interação pelo qual os organismos enviam e recebem informações sobre si e sobre o seu meio. Em interações mediadas quimicamente, as substâncias são liberadas por um indivíduo (emissor), transportadas através do meio fluido e, em última instância, recebidas por outro organismo o receptor (Figura I.1) (WEBSTER & WEISSBURG, 2009). O organismo emite substâncias que podem ser denominadas infoquímicos (Figura I.2; DICKE & SABELIS, 1988), pistas ou sinais químicos (SALEH *et al.*, 2007; WEBSTER & WEISSBURG, 2009). Estas terminologias foram designadas de acordo com a análise de custo/benefício dessa sinalização quando se refere à infoquímicos e quando se leva em consideração o aspecto evolutivo envolvido na produção, detecção e processamento dessas informações tratadas como pistas ou sinais químicos. Uma vez dispersa no meio aquático, estas substâncias são transportadas espacial- e temporalmente através da advecção e difusão molecular ou turbulência formando plumas de odores ou plumas químicas (Figura I.3) (ZIMMER & BUTMAN, 2000) que são percebidas pelos organismos receptores. Os organismos receptores possuem estruturas quimiossensoriais específicas que detectam

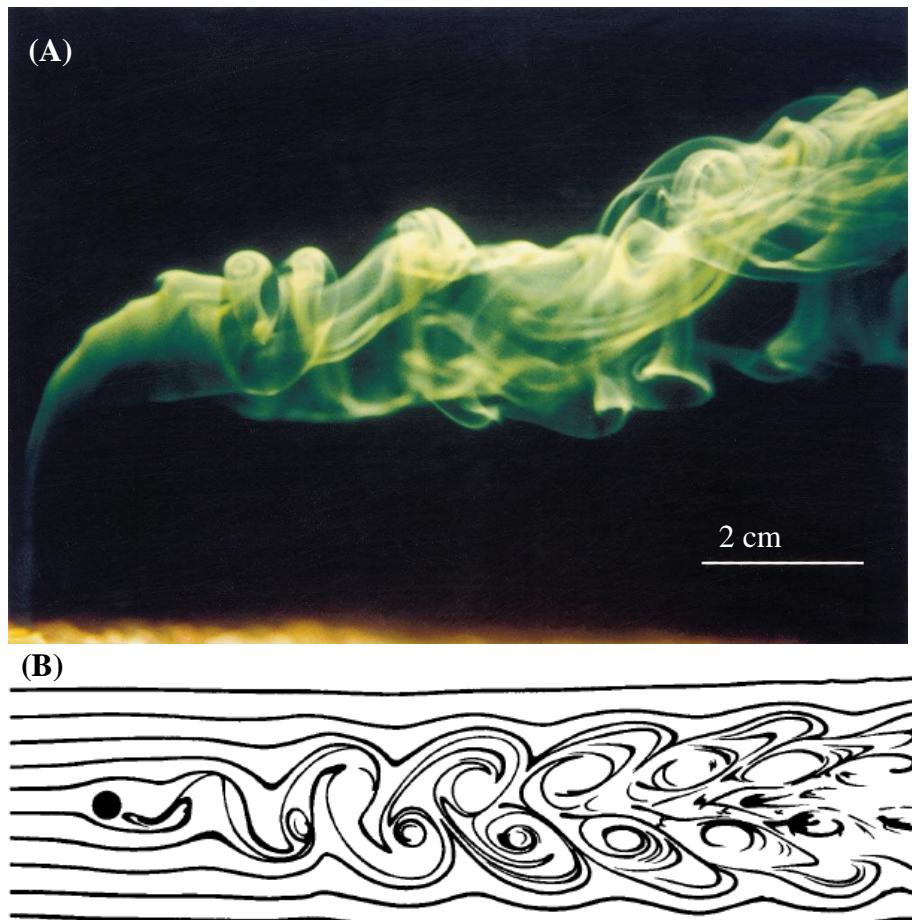
adequadamente os estímulos químicos produzindo mudanças comportamental e/ou fisiológica (ATEMA, 1995; VICKERS, 2000; STEIGER *et al.* 2011; WISENDEN, 2015a).



**Figura I.1.** Diagrama dos processos envolvidos na comunicação química entre organismos aquáticos. Adaptado de WEBSTER & WEISSBURG, 2009



**Figura I.2.** Esquema adaptado da estrutura da terminologia de infoquímicos proposta por DICKE & SABELIS (1988), destacando o custo/benefício da sinalização para os organismos envolvidos: (+) = resposta favorável e (-) = resposta desfavorável.



**Figura I.3.** (A): Pluma de odor liberada pelo molusco bivalve *Merenaria mercenaria*. (B): Interpretação do vórtices/redemoinhos de turbulência gerado por difusão molecular apartir da região de emissão mais concentrada (esquerda da imagem) dipersando para regiões de menor concentração (direita da imagem) criando “via” de odores. Imagens retiradas de ZIMMER & BUTMAN, 2000.

A natureza química dos metabólitos que medeiam interações como reprodução, assentamento larval, busca de hospedeiros, alimentação e alelopatia são muitas vezes desconhecidas, e sua presença e transporte geralmente são assumidos com base nas observações das respostas do receptor. Dentre as substâncias que foram identificadas até o momento, muitas são advindas do metabolismo secundário. No entanto, alguns outros metabólitos primários são igualmente importantes foram caracterizados como mediadores químicos em interações biológicas, como proteínas, peptídeos e aminoácidos (HADFIELD & PAUL, 2001; RITTSCHOOF & COHEN, 2004; KITA *et al.*, 2010; CUMMINS & BOWIE, 2012; WYATT, 2014).

Identificar os estímulos químicos de sinalização é, em sua maioria dos casos, um desafio, pois as substâncias que medeiam a percepção à distância são liberadas na água em

concentrações ínfimas. Consequentemente, a extração e a identificação podem ser dificultadas pela diluição considerável do estímulo. Além disso, essas substâncias são transportadas por um fluxo, sendo também necessário determinar as suas propriedades em fluidos turbulentos. Apesar das dificuldades e limitações, o progresso na compreensão tanto da natureza química de substâncias responsáveis pela sinalização marinha como do papel dos processos físicos na estruturação de sinais de odor, são de extrema importância para que a análise das implicações das interações ecológicas mediada quimicamente seja viável (WEISSBURG *et al.*, 2002)

As substâncias dissolvidas e adsorvidas na água medeiam a sinalização de processos importantes ao longo da vida de um organismo, que vão desde a reprodução, o assentamento e a metamorfose larval e a seleção de hospedeiros, até a interação presa-predador, o forrageamento e a alelopatia (HAY, 2009). As interações tróficas estão apresentadas em maior detalhamento a seguir.

As interações tróficas, herbívoro-planta e predador-presa desempenham um papel primário e vital para a sobrevivência dos organismos e são importantes na dinâmica populacional, estrutura das comunidades marinhas e na sustentabilidade dos oceanos mundiais (ABRAMS, 2000). Por exemplo, inúmeras substâncias foram relatadas com o papel de impedir, inibir ou matar potenciais consumidores nas relações herbívoro-planta e predador-presa. No entanto, assim como algumas substâncias dissuadem os consumidores, outras permitem que eles se identifiquem e localizem suas presas à distância ou atuem como alerta para as presas quanto a um risco de predação (WEISSBURG *et al.*, 2002). O uso de infoquímicos nas interações tróficas já foi descrito para diversos grupos de invertebrados como crustáceos, moluscos, equinodermas e anelídeos (KAMIO & DERBY, 2017) e em macroalgas marinhas (TOTH & PAVIA, 2007).

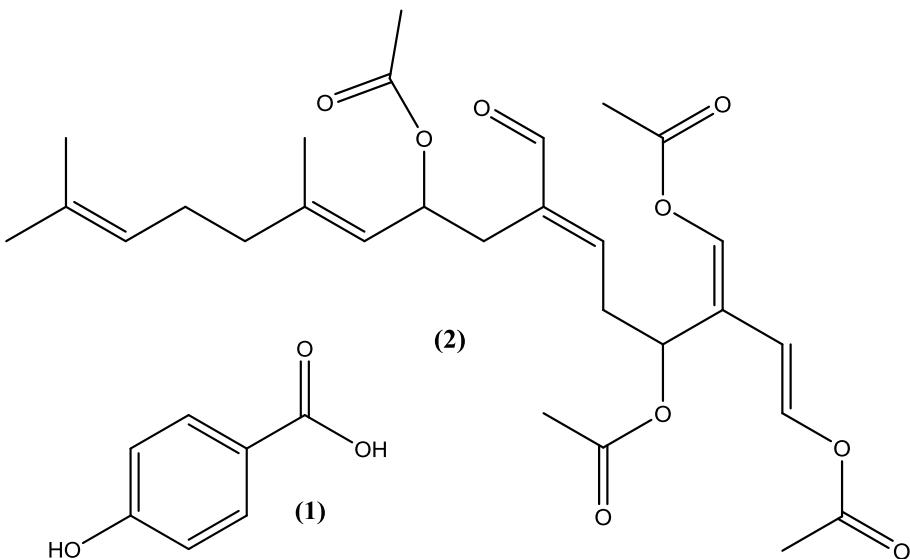
Para localizar alimentos, consumidores móveis em habitats aquáticos detectam e se movem em direção a fontes de produtos químicos atraentes. Predadores estabelecem estratégias de captura de suas presas reconhecendo pistas químicas de presas feridas e vulneráveis, o tamanho apropriado da presa para consumo (LONNSTEDT *et al.*, 2012), assim como a densidade populacional da presa (ELVIDGE & BROWN, 2012; HUGHES *et al.*, 2012).

Entretanto, da mesma forma que um predador localiza sua presa, reconhecer os sinais de um predador pode significar a sobrevivência de uma presa, pois eles induzem mudanças defensivas que diminuem o risco de serem consumidas. Essas pistas são conhecidas como

substâncias de alarme ou “cheiro da morte”, e são de extrema importância no contexto de risco eminente de predação (WEISSBURG *et al.*, 2002). O odor do predador é a pista química mais óbvia pelo qual a presa detecta o risco de predação. Indivíduos juvenis e adultos de diversas espécies reconhecem a presença de predadores e respondem com mudanças de comportamento, mantendo-se em locais abrigados (ROSEN *et al.*, 2009; JOHNSTON *et al.*, 2012; WILKINSON *et al.*, 2015; CEREZER *et al.*, 2016), se distanciando do predador (SCHAUM *et al.*, 2013), intensificando movimentos de fuga (COHEN & RITZ, 2003); variando morfologias defensivas como aumento de espessura da concha (TRUSSELL & SMITH, 2000; DALZIEL & BOULDING, 2005), do exoesqueleto (SELDEN *et al.*, 2009), alterando estruturas reprodutivas (SELDEN, *et al.*, 2009) e exibindo comportamento de agregação como forma de defesa (JOHANNESEN *et al.*, 2014).

As indicações de alarme químico também são liberadas por tecidos de indivíduos coespecíficos danificados durante o ataque e a captura, indicando perigo claro à presença de um predador, e provocando respostas comportamentais e fisiológicas intensas antipredadores (MORISHITA & BARRETO, 2011; KOBAK & RYŃSKA, 2014; CASTORANI & HOVEL, 2016), sinalizando um alto risco de predação, até mais intenso que a própria pista do predador (KEPPEL & SCROSATI, 2004) em indivíduos vizinhos. Além disso, presas apresentam respostas de fuga a predadores que foram alimentados com seu coespecífico (JACOBSEN& STABELL, 2004).

Pistas químicas também medeiam interação herbívoro-planta na busca de alimento pelo herbívoro. Apesar de poucos estudos, comparados àqueles sobre a interação presa-predador, existem alguns exemplos de herbívoros marinhos que usam metabólitos produzidos por algas hospedeiras para sua orientação. Recentemente, foi verificado que *Elysia tuca* (Sacoglossa) localiza sua fonte alimentar *Halimeda incrassata* rastreando o ácido 4-hidroxibenzoico (**1**) e o halimedatetraacetato (**2**) exsudado por esta alga também hospedeira, diferenciando-a em estágios vegetativos e reprodutivos pela presença desses dois metabólitos, respectivamente (RASHER *et al.* 2015). Espécies de gastrópodes das ordens Sacoglossa e Anaspidea (*Aplysia* – lesmas do mar) identificam as substâncias presentes na água e exibem um comportamento específico de movimento de cabeça e órgãos sensoriais em resposta a estímulos alimentares (BORNANCIN *et al.*, 2017). Entretanto, a identidade desses sinais e pistas é desconhecida, especialmente na interação *Aplysia* (Linnaeus, 1767) e macroalga (KAMIO & DERBY, 2017).



Ainda nos estudos das interações herbívoro-planta, também foi proposto que as macroalgas podem reconhecer sinais de alerta de tecidos coespecíficos danificados e pistas emitidas pelo herbívoro, induzindo respostas anti-herbivoria. Alguns estudos demonstraram claramente a respostas de indução de defesas por pistas transmitidas pela água por macroalgas marrons vizinhas consumidas (PAVIA & TOTH, 2000; ROHDE, *et al.*, 2004; WAHL, 2004; MACAYA *et al.*, 2005; TOTH, 2007; YUN *et al.*, 2007, 2012); algas verdes (DÍAZ *et al.*, 2006; TOTH, 2007) e vermelhas (TOTH, 2007). Em menor número, alguns pesquisadores ainda relataram a habilidade de algumas macroalgas responderem às pistas emitidas somente pela presença do herbívoro (DÍAZ *et al.*, 2006; TOTH, 2007; YU *et al.*, 2007). Entretanto, os estudos sobre as respostas de defesa induzidas em macroalgas em interações mediadas por pistas químicas ainda foi apontado como algo bastante controverso (TOTH & PAVIA, 2007) e que assim permanece nos dias atuais.

As interações tritróficas entre os diferentes níveis de uma teia alimentar também são aspectos evidenciados no ambiente marinho. A liberação de substâncias químicas após o ataque das espécies de nível trófico intermediário pode fornecer indícios de alimento para predadores do topo da cadeia, promovendo assim interações multitróficas. Os efeitos indiretos da atração dos predadores de topo alteram o comportamento do mesopredador ou mesoherbívoro, modificando sua interação com a presa, reduzindo significativamente sua atividade de alimentação e favorecendo os níveis tróficos inferiores (SIDDON & WITMAN, 2004; COLEMAN *et al.*, 2007; SAVOCA & NEVITT, 2014; LÖNNSTEDT & MCCORMICK, 2015; DEL MAR PALACIOS *et al.*, 2016).

## I.2. RELAÇÃO ECOLÓGICA E QUÍMICA ENTRE OS HERBÍVOROS DO GÊNERO *Aplysia* E ALGAS VERMELHAS DO GÊNERO *Laurencia*

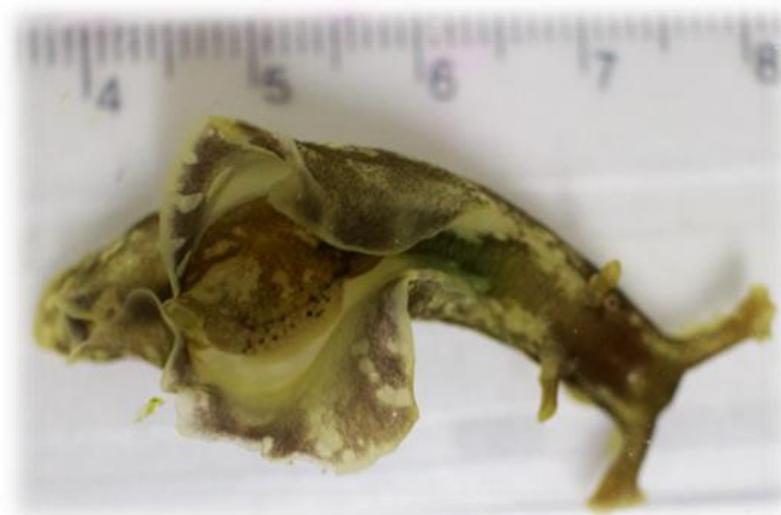
Os herbívoros desempenham papéis centrais na regulação e estruturação de ecossistemas, determinando padrões espaciais de abundância e distribuição de biodiversidade (LAPOINTE *et al.*, 2004). Devido à pressão de herbivoria exercida sobre as macroalgas no ambiente marinho, elas desenvolveram uma variedade de estratégias para minimizar o consumo ou assegurar sua sobrevivência, como defesas morfológicas, defesa associada, baixo valor nutricional e as defesas químicas (HAY & FENICAL, 1988; HAY, 1996). Em relação às defesas químicas, pode-se destacar a ação dos metabólitos secundários (ou produtos naturais) que desempenham um papel importante na proteção de algas contra seus potenciais consumidores, alterando sua atratividade e palatabilidade (PEREIRA & DA GAMA, 2008).

Entre as macroalgas marinhas, as espécies vermelhas do gênero *Laurencia* (J.V.Lamouroux, 1813) (Figura I.4) são conhecidas como as mais prolíficas na química de produtos naturais, produzindo metabólitos secundários singulares como sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, acetogeninas, alcaloides indólicos, substâncias aromáticas e esteroides, muito deles halogenados (HARIZANI *et al.*, 2016). Estes metabólitos de espécies de *Laurencia* não só possuem características estruturais únicas, mas também exibem interessantes e notáveis propriedades ecológicas, atuando como agentes anti-incrustantes que impedem o assentamento de organismos bentônicos (DA GAMA *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2003) e agentes alelopáticos, impedindo o crescimento de macro- e microalgas e bactérias (HELLIO *et al.*, 2002; VAIRAPPAN *et al.*, 2010). Entre as funções ecológicas dos metabólitos de *Laurencia*, se destacam a defesa química contra diversos herbívoros marinhos como anfípoda (ARGANDOÑA *et al.*, 1993), moluscos ( GRANADO & CABALLERO, 1995; KURATA *et al.*, 1998), ouriço-do-mar (HAY *et al.*, 1987; KURATA *et al.*, 1998; PEREIRA *et al.*, 2003), peixes recifais (PAUL & HAY, 1986; HAY, *et al.*, 1987) e crustáceos (PEREIRA *et al.*, 2003). A defesa química contra herbívoros é uma das principais funções ecológicas constatadas para metabólitos secundários de *Laurencia*. Contudo, diversos estudos evidenciaram que espécies de *Laurencia* fazem parte da dieta de gastrópodes do gênero *Aplysia* - Mollusca; Opistobranchia, Anaspidea (HARIZANI, *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2016).



**Figura I.4.** Banco de *L. dendroidea* na praia Azeda (Armação dos Búzios - RJ). Foto: Nathália Nocchi.

Espécies do gênero *Aplysia* (Figura I.5), também conhecidas como lebres do mar, são herbívoros de rápido crescimento e que vivem em comunidades marinhas bentônicas tropicais e subtropicais, alimentando-se preferencialmente de algas químicamente defendidas, sendo capazes de ingerir quantidades consideráveis de espécies vermelhas, verdes e pardas (CAREFOOT, 1970). Apresentam mobilidade lenta (comparado a herbívoros como crustáceos e peixes), corpo mole e concha reduzida, e, portanto, seriam altamente vulneráveis aos predadores se não fosse pela variedade de defesas que podem exibir. Estas defesas incluem coloração críptica, comportamento, tamanho grande, capacidade de produzir muco e, mais notavelmente, as defesas químicas (WÄGELE & KLUSSMANN-KOLB, 2005). Elas são capazes de sequestrar os metabólitos de defesa do seu alimento, armazenando-os e/ou modificando-os em glândulas próprias, e utilizando-os contra seus predadores (CHAPMAN & FOX, 1969; MANZO *et al.*, 2007). As defesas químicas das lebres do mar podem ser passivas, quando estão constitutivamente presentes em sua pele, tecidos e muco ou ativas, e liberadas em secreção de tinta sob o controle do sistema nervoso apenas quando o animal é atacado por um predador (GINSBURG & PAUL, 2001). Esta tinta é capaz de alterar o padrão de comportamento dos predadores por dessensibilização quimiosensorial facilitando a fuga da lebre do mar (CAREFOOT *et al.*, 1999; KICKLIGHTER *et al.*, 2005, 2007; JOHNSON, 2006; KICKLIGHTER & DERBY, 2006; AGGIO & DERBY, 2008; SHEYBANI *et al.*, 2009; KAMIO *et al.*, 2010; NUSNBAUM & DERBY, 2010).



**Figura I.5.** Visão dorsal de um indivíduo de *A. brasiliiana*. Foto: Roberto Sousa.

Algumas revisões abrangentes sobre *Laurencia* e *Aplysia* tiveram foco na química (WANG *et al.*, 2013; JI & WANG, 2014; WANKE *et al.*, 2015; HARIZANI *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2016) e na relação trófica expressa por similaridade química (PEREIRA & TEIXEIRA, 1999). Nos tópicos abaixo, buscou-se fornecer uma visão abrangente sobre a especificidade alimentar das lebres do mar e a relação ecológica e química entre espécies dos táxons.

### I.2.1. *Aplysia* spp.: um importante herbívoro marinho

As interações entre as defesas químicas de macroalgas e as suas consequências em seus herbívoros são bastante complexas e nem sempre tão óbvias. Os metabólitos de defesas de macroalgas marinhas inibem a herbivoria, mas geram consequências pós-ingestivas e na evolução de seletividade e especialização alimentar dos herbívoros. Por exemplo, no contexto de seletividade alimentar, os herbívoros foram convencionalmente agrupados em categorias com base no seu grau de especialização alimentar. Quando limitado a apenas um ou alguns táxons estreitamente relacionados, muitas vezes um único gênero, os herbívoros são considerados monófagos ou especialistas, enquanto aqueles que se alimentam de várias espécies, geralmente dentro de uma família botânica, são designados oligófagos. Finalmente, espécies polífagas ou generalistas são herbívoros que se alimentam de espécies de mais de uma família (ALI & AGRAWAL, 2012).

Em comunidades marinhas, herbívoros como peixes, ouriços-do-mar e alguns crustáceos e gastrópodes são dominantes e comumente são consumidores extremamente generalistas, enquanto a especificidade alimentar está associada a mesoherbívoros (0,2-25mm) com mobilidade limitada e que estão sujeitos a elevadas taxas de predação, e por isso tendem a viver em associação, camuflar-se e alimentar-se de macroalgas quimicamente defendidas que lhes proporcionem uma proteção significativa dos seus predadores (HAY & FENICAL, 1988; HAY *et al.*, 1988; PENNINGS, 1990; HAY, 1998). A disponibilidade de recursos ou outros fatores comumente hipotetizados para a especialização alimentar são considerados menos importantes para mesoherbívoros, uma vez que suas populações são frequentemente limitadas por predadores e raramente por alimentos; assim, a predação é o principal fator para a seleção alimentar específica de herbívoros no ambiente marinho (HAY *et al.*, 1990; HAY, 1998 ).

Os herbívoros marinhos melhor estudados, considerados especialistas por alguns autores, são os gastrópodes opistobrânquios, entre eles os das ordens Anaspidea e Sacoglossa. Esses herbívoros evoluíram de gastrópodes com concha para lesmas do mar sem concha ou com concha interna reduzida, à medida que desenvolveram a capacidade de se alimentar de macroalgas quimicamente defendidas, desintoxicar e sequestrar, bem como sintetizar substâncias defensivas *de novo* e utilizar os metabólitos dessas algas para sua própria defesa (FAULKNER & GHISELIN, 1983; WÄGELE & KLUSSMANN-KOLB, 2005).

Muitos autores consideram o gênero *Aplysia* como herbívooro marinho especialista por sequestrar e armazenar metabólitos das macroalgas quimicamente defendidas, das quais se alimentam preferencialmente, tais como espécies dos gêneros *Dictyota*, *Dictyopteris*, *Glossophora*, *Laurencia*, *Plocamium* e *Asparagopsis*. Entretanto, esses herbívoros também se alimentam de uma ampla variedade de outras espécies de macroalgas que não produzem metabólitos secundários de defesa (ROGERS *et al.*, 1995; 2002). Além disso, outros fatores como o grande tamanho que podem atingir (mais de 50 cm na fase adulta), a baixa mobilidade e a rápida taxa de crescimento e alimentação, poderiam esgotar rapidamente o seu estoque alimentar local, forçando a sua migração para outros hospedeiros (PENNINGS, 1991). Estes aspectos impedem que estes consumidores se tornem exclusivamente especialistas, mas sim oligofágicos. Contudo, mesmo que lebres do mar não sejam estritamente especializadas em somente um único táxon, elas são claramente mais especializadas do que a maioria dos herbívoros marinhos, na medida em que se associam e se alimentam seletivamente de

macroalgas quimicamente defendidas e delas sequestram metabólitos secundários (HAY, 1992).

Apenas espécimes adultos de *Aplysia* são oligofágicos, uma vez que os juvenis são consumidores mais especializados. Por exemplo, os juvenis geralmente crescem melhor se alimentando de macroalgas quimicamente defendidas, enquanto indivíduos adultos têm dieta geralmente mais ampla, embora o crescimento seja frequentemente melhor em algas que consumiram como juvenis (KUPFERMANN & CAREW, 1974). Indivíduos adultos (10-30 cm) de *A. californica* são conhecidos por consumirem macroalgas dos gêneros *Plocamium*, *Laurencia*, *Ulva*, *Entheromorpha* e *Codium*, enquanto juvenis (1-5 cm) preferem apenas *Plocumium*, *Laurencia* e *Ulva*, e recrutas (0,05-0,15 cm) somente *Laurencia* e *Plocamium*. Apesar de larvas de *A. californica* se estabelecerem em uma grande variedade de macroalgas em laboratório, podem se deslocar após a metamorfose para macroalgas que preferem consumir. No entanto, no ambiente natural, indivíduos pequenos ( $\leq 2$  cm; mesoherbívoro) de *A. californica* são encontrados quase que exclusivamente, e de forma críptica, em *Plocamium* e *Laurencia*, e não consomem completamente essas macroalgas hospedeiras (KANDEL, 1974; PAWLICK, 1989; PENNINGS, 1990, 1991). A mesma relação foi observada em campo para a espécie *A. brasiliensis*, onde juvenis e recrutas foram encontrados predominantemente associados ou camouflados em espécimes de *L. dendroidea* e adultos em outras macroalgas e até mesmo expostos no costão ou na coluna d'água (observação pessoal da autora).

Assim, a preferência alimentar do gênero *Aplysia* por macroalgas quimicamente defendidas, entre elas espécies de *Laurencia*, pode ser alterada ao longo do desenvolvimento do indivíduo e pode ser condicionada pela necessidade de se defender da predação e não simplesmente por escolha de uma dieta única. Entretanto, mesmo que indivíduos do gênero *Aplysia* se alimentem preferencialmente de macroalgas com defesas químicas, a variação intra- e inter-específica dos metabólitos na macroalga pode influenciar sua taxa de consumo, pois concentrações elevadas de metabólitos podem diminuir o consumo desses herbívoros e, consequentemente, aumentar sua palatabilidade aos predadores (GINSBURG & PAUL, 2001).

### I.2.2. *Laurencia* como recurso ecológico para espécies de *Aplysia*

Diferentes espécies de lebres do mar, como *A. californica*, *A. brasiliiana*, *A. dactylomela* e *A. parvula* são conhecidas por consumirem macroalgas vermelhas, entre elas várias espécies de *Laurencia*. Embora existam dados sobre a estreita relação ecológica desses dois táxons, a maioria dos estudos se concentra até os anos 90 e alguns detalhes biologicamente importantes dessa relação permanecem pouco claros ou são conhecidos apenas com base em provas circunstanciais e generalizadas para todo o grupo a partir de estudos com base em um pequeno número de espécies de lebres marinhas e macroalgas. Aqui são reunidos estudos que abordam a interação ecológica entre espécies de *Laurencia* e *Aplysia*.

Primeiramente, os indivíduos de *Aplysia* necessitam localizar suas macroalgas hospedeiras e a quimiorrecepção à distância tem sido reconhecida como de primordial importância para a detecção de alimentos, por exemplo, por gastrópodes (KOHN, 1983). Espécies de *Aplysia* apresentam estruturas e comportamentos que auxiliam na varredura, busca e encontro de alimento/abrigos, como os tentáculos orais e rinóforos em *A. californica* que atuam como quimioreceptores de pistas químicas liberadas por indivíduos de *L. pacifica* (AUDESIRK, 1975). O comportamento de busca de alimento em *A. brasiliiana* inclui um movimento característico de balanço da cabeça na superfície da água durante a natação, emergindo momentaneamente seus órgãos sensoriais quando se aproximava de indivíduos de *L. pacifica* (ASPEY *et al.*, 1977). A soma de órgãos sensoriais, estímulos no sistema nervoso central e comportamento permitiram a aprendizagem de *A. californica* no reconhecimento rápido de *Laurencia* como importante recurso alimentar (CHIEL & SUSSWEIN, 1993).

As macroalgas vermelhas do gênero *Laurencia* são um importante recurso para espécies *Aplysia* desde seus primeiros estágios de vida, e estudos demonstram a importância desta preferência para a metamorfose deste molusco. Quando exposta a diferentes macroalgas, em experimentos de laboratório, as larvas de *A. californica* responderam melhor, com desencadeamento de metamorfose em espécies de *Laurencia* (NADEAU *et al.*, 1989; PAWLICK, 1989) e esta afinidade permanece quando são recrutas e juvenis. Quando adultos, os indivíduos de *Aplysia* continuam preferindo *Laurencia*, porém, ampliam a gama de recursos alimentares com outras macroalgas (KANDEL, 1974; KANDEL *et al.*, 1980; PENNINGS, 1990). Das várias macroalgas hospedeiras disponíveis para as lebres do mar durante o crescimento e nutrição na fase adulta, foi constatado que indivíduos de *A. parvula*

alimentados com *L. obtusa* (alga menos abundante em campo), não só se alimentaram mais, mas também cresceram mais rapidamente, puseram mais ovos e tiveram maior sobrevivência, tanto em experimentos de laboratório quanto em campo, que quando alimentadas com outras macroalgas verdes, pardas e até outras vermelhas (ROGERS *et al.*, 1995, 2002). Estas evidências atestam que *Laurencia* é um excelente recurso alimento para o gênero *Aplysia* ao longo do seu desenvolvimento.

Várias espécies de *Aplysia*, ao se alimentarem de espécies de *Laurencia*, armazenam e/ou metabolizam os metabólitos destas macroalgas em glândulas digestivas, no manto e na tinta, podendo utilizá-los posteriormente para sua própria defesa contra predadores (CHAPMAN & FOX, 1969; STALLARD & FAULKNER, 1974a, 1974b; RUSSELL, 1984). Entretanto, os efeitos da dieta sobre a aptidão e a susceptibilidade das lebres do mar aos predadores são pouco compreendidos. A tinta roxa secretada por *Aplysia*, considerada um mecanismo de defesa, apresenta a aplisioviolina e a ficoeritrobilina como principais componentes responsáveis pela coloração (RÜDIGER, 1967; RÜDIGER *et al.*, 1967). Esses dois metabólitos são produzidos em maior quantidade quando *A. californica* se alimenta de espécies de *Laurencia*, pois aplisioviolina é derivada da ficoeritrobilina, que por sua vez tem como precursora a ficoeritrina produzida por esta macroalga, porém, estas substâncias não tinham sido correlacionadas diretamente ao mecanismo defensivo do animal, e sim reconhecidas como resíduos de pigmentos biliares indesejados da sua dieta (CHAPMAN & FOX, 1969). Entretanto, posteriormente foi evidenciada a ação defensiva de aplisioviolina e da ficoeritrobilina contra o ataque do caranguejo *Callinectes sapidus*, sendo aplisioviolina o metabólito majoritário e mais importante no papel defensivo da tinta (KAMIO *et al.*, 2010).

Além disso, um meio alternativo pelo qual espécies de *Aplysia* podem evitar a predação seria viver em hospedeiros quimicamente defendidos, como espécies de *Laurencia*. Vários grandes herbívoros generalistas, como crustáceos, ouriços e peixes são fortemente dissuadidos pela química de espécies de *Laurencia*, tornando estas macroalgas refúgios ideais para as lebres do mar. Além do mais, estudos já avaliaram o papel de metabólitos de *Aplysia*, sequestrados de *Laurencia*, atuando como defesa química contra peixes de recifais (HAY *et al.*, 1987) e exibindo toxicidade contra crustáceos (JONGARAMRUONG *et al.*, 2002).

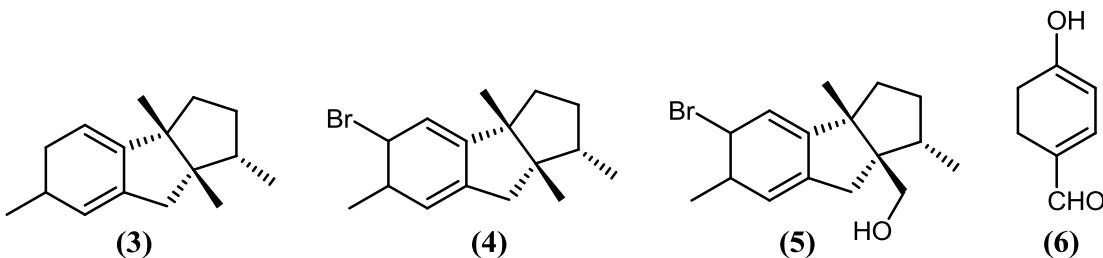
### I.2.3. Diversidade de metabólitos secundários em *Aplysia* e *Laurencia*

Entre os moluscos e macroalgas marinhas, as lebres do mar do gênero *Aplysia* e as espécies de *Laurencia* são as mais estudadas pelos químicos de produtos naturais marinhos. Muitas espécies do gênero *Laurencia* fazem parte da dieta de *Aplysia* spp., sendo uma rica e variada fonte de metabólitos secundários para esses herbívoros. Cerca de 200 metabólitos (Tabelas Anexo 1 e Anexo 2), muitos deles halogenados, foram isolados de *Laurencia* e *Aplysia*.

A primeira abordagem sobre os metabólitos secundários de *Aplysia* data de 1963, quando YAMAMURA & HIRATA isolaram os sesquiterpenos desbromoaplisina (**3**), aplisina (**4**) e aplisinol (**5**) de *A. kurodai*. Seis anos depois esses mesmos metabólitos foram isolados de *L. okamurai* (IREI, *et al.*, 1969), já evidenciando a estreita relação química entre estes dois táxons. Desde então, diversos metabólitos comuns a estes dois gêneros já foram isolados (Tabela Anexo 1). Embora a primeira investigação química de uma espécie de *Aplysia* tenha sido relatada há mais de cinco décadas, a capacidade das lebres marinhas em concentrar e transformar produtos naturais de várias espécies de macroalgas, principalmente de espécies de *Laurencia*, continua a fazer destes moluscos organismos atraentes para a química de produtos naturais.

Dentre o amplo espectro de metabólitos de *Aplysia* encontram-se substâncias halogenadas, ou não, provenientes de sua dieta alimentar e pertencentes às classes metabólicas dos sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, acetoganinas, alcaloides indólicos e substâncias aromáticas. A Tabela do Anexo 1 apresenta os metabólitos em comum isolados de espécies de *Aplysia* e *Laurencia*, destacando a origem histológica dessas substâncias no herbívoro. Embora a maioria dos metabólitos apresentados nesta tabela seja conhecido por serem produzidos por *Laurencia* spp., os mesmos foram isolados da lebre do mar do gênero *Aplysia*.

Das substâncias descritas para *Laurencia* em revisões prévias (HARIZANI *et al.*, 2016), 12,3% também já foram isoladas de espécies do gênero *Aplysia*. Num total, essas substâncias comuns a esses dois gêneros somam 118 metabólitos (Anexo 1). Dentre essas substâncias, os terpenos são a classe estrutural mais representativa, totalizando 93 metabólitos em comum isolados, sendo os sesquiterpenos os mais abundantes; seguido por acetogeninas C15, com 20 substâncias isoladas, e por último, substância aromática com somente um metabólito, o 4-hidroxi-benzaldeído (**6**), isolado de *A. dactylomela*, *L. papillosa* e *L. tristicha*.

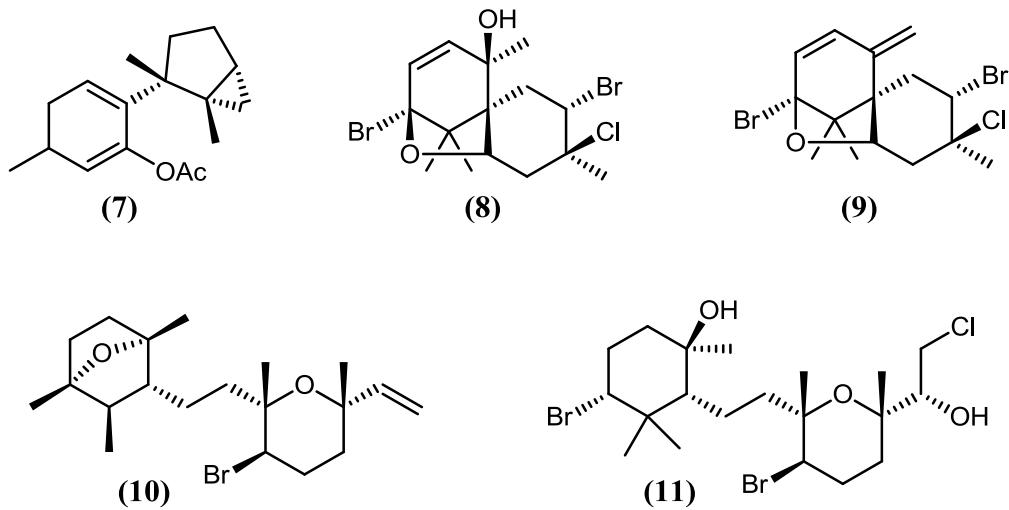


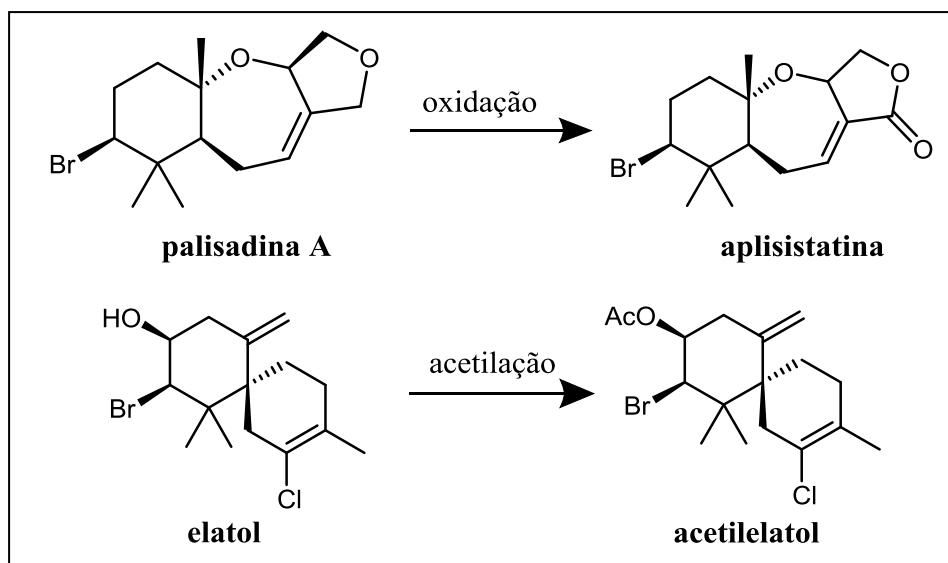
A maioria das substâncias de *Laurencia* isoladas em *Aplysia* estava concentrada nas glândulas digestivas, evidenciando a importância deste órgão no armazenamento destes produtos, principalmente os halogenados. Muitos estudos extraíram o animal inteiro (observar na Tabela Anexo 1), colocando em dúvida a origem histológica destes produtos e levantando até ao questionamento sobre esses produtos serem de macroalgas não digeridas. Entretanto, ao longo do detalhamento das pesquisas dos metabólitos de *Aplysia*, viu-se que as glândulas digestivas apresentavam elevadas concentrações de metabólitos considerados tóxicos, muitos deles provenientes de sua dieta à base de macroalgas, confirmando sua função no armazenamento dessas substâncias (STALLARD & FAULKNER, 1974a, 1974b; IRELAND *et al.*, 1976; PEREIRA *et al.*, 2016). A glândula digestiva é o maior dos órgãos internos da lebre marinha *A. californica*, compreendendo aproximadamente 5-10 % do seu peso corporal total. Análises demonstraram que este órgão contém quantidades grandes de bromo devido à presença de substâncias organo-bromadas, muitas delas também isoladas de espécies de *Laurencia* (STALLARD & FAULKNER, 1974a). Estes metabólitos são os principais responsáveis pela toxicidade descrita para as glândulas digestivas de *A. californica*, onde as mesmas foram regurgitadas pela anêmona *Anthopleura xanthogrammica* após ingestão (WINKLER & TILTON, 1962).

As glândulas digestivas também são capazes de modificar os metabólitos de *Laurencia* em derivados ou em novos metabólitos biossintetizados (*de novo*) pelo próprio molusco (PEREIRA *et al.*, 2016). Algumas hipóteses já foram discutidas sobre a razão dessas modificações em lebres do mar: para aumentar a eficácia da defesa química; como transformação química passiva quando a substância passa pelo intestino e glândula digestiva; ou como o primeiro passo de um mecanismo de desintoxicação (PAUL & PENNINGS, 1991). Essas observações levaram a questionamentos em relação à função da glândula digestiva: este órgão seria usado exclusivamente para o armazenamento de produtos químicos

tóxicos para uso como um mecanismo de defesa, ou esses produtos químicos tóxicos sofrem transformações químicas na glândula digestiva (STALLARD & FAULKNER, 1974b)?

Alguns exemplos de modificação química de produtos de *Laurencia* por lebres do mar já foram descritos. Por exemplo, *A. californica* converte o laurinterol (**7**) e o pacifenol (**8**), metabólitos de espécies de *Laurencia*, em aplisina (**5**) e pacifideno (**9**), respectivamente, na glândula digestiva (STALLARD & FAULKNER, 1974b). O dactilopiranoide (**10**), isolado de *A. dactylomela*, é uma estrutura derivada de laurencianol (**11**), isolado da alga *Laurencia obtusa* (WESSELS, *et al.*, 2000). A aplysistatina foi descrita em *A. angasi* como um provável produto de oxidação do metabólito palisadina A de *Laurencia* (PETTIT *et al.*, 1977); assim como elatol, produto de espécies de *Laurencia*, foi acetilado na glandula digética de *A. dactylomela* formando acetilelatol (DIAS *et al.*, 2005) (Figura II.6). O Anexo 2 reúne uma tabela com os derivados formados a partir de produtos de *Laurencia* isolados em espécies de *Aplysia*, incluindo origem histológica destes metabólitos neste molusco.





**Figura I.6.** Reações representativas de oxidação (PETTIT *et al.*, 1977) e acetilação (DIAS *et al.*, 2005) realizadas por *Aplysia* com precursores obtidos a partir da sua dieta com macroalga do gênero *Laurencia*.

### I.3. REFERÊNCIAS

- ABRAMS, P. A. 2000. The evolution of predator-prey interactions: theory and evidence. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31: 79–105.
- AGGIO, J. F.; DERBY, C. D. 2008. Hydrogen peroxide and other components in the ink of sea hares are chemical defenses against predatory spiny lobsters acting through non-antennular chemoreceptors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 363: 28–34.
- ALI, J. G.; AGRAWAL, A. A. 2012. Specialist versus generalist insect herbivores and plant defense. *Trends in Plant Science*, 17: 293–302.
- ARGANDOÑA, V. H.; SAN-MARTÍN, A.; ROVIROSA, J. 1993. Halogenated sesquiterpenes pacifenol and pacifenol derivatives on the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry*, 32 (5): 1159–1161.
- ASPEY, W. P.; COBBS, J. S.; BLANKENSHIP, J. E. 1977. Aplysia behavioral biology: III. Head-Bobbing in relation to food deprivation in *A. Brasiliana*. *Behavioral Biology*, 19: 300–308.
- ATEMA, J. 1995. Chemical signals in the marine environment: dispersal, detection, and temporal signal analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 62–66.
- AUDESIRK, T. E. 1975. Chemoreception in *Aplysia californica*. I. Behavioral localization of distance chemoreceptors used in food-finding. *Behavioral Biology*, 15: 45–55.
- BORNANCIN, L.; BONNARD, I.; MILLS, S. C.; BANAIGS, B. 2017. Chemical mediation as a structuring element in marine gastropod predator-prey interactions. *Natural Product Reports*, 34: 644–676.
- CASTORANI, M. C. N.; HOVEL, K. A. 2016. Native predator chemical cues induce anti-predation behaviors in an invasive marine bivalve. *Biological Invasions*, 18: 169–181.
- CAREFOOT, T. H. 1970. A comparison of absorption and utilization of food energy in two species of tropical *Aplysia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 5: 47–62.

- CAREFOOT, T. H.; PENNINGS, S. C.; DANKO, J. P. **1999**. A test of novel function (s) for the ink of sea hares. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 234: 185–197.
- CEREZER, C.; BIASI, C.; COGO, G. B.; SANTOS, S. **2016**. Avoid predation or take risks in basic activities? Predator–prey relationship in subtropical streams between decapods and caddisflies. *Marine and Freshwater Research*, 67: 1880 - 1887.
- CHAPMAN, D. J.; FOX, D. L. **1969**. Bile pigment metabolism in the sea-hare *Aplysia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 4: 71–78.
- CHIEL, H. J.; SUSSWEIN, A. J. **1993**. Learning that food is inedible in freely behaving *Aplysia californica*. *Behavioral neuroscience*, 107: 327 -338.
- COHEN, P. J.; RITZ, D. A. **2003**. Role of kairomones in feeding interactions between seahorses and mysids. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 83: 633–638.
- COLEMAN, R. A.; RAMCHUNDER, S. J.; DAVIES, K. M.; MOODY, A. J.; FOGGO, A. **2007**. Herbivore-induced infochemicals influence foraging behaviour in two intertidal predators. *Oecologia*, 151: 454–463.
- CUMMINS, S. F.; BOWIE, J. H. **2012**. Pheromones, attractants and other chemical cues of aquatic organisms and amphibians. *Natural Product Reports*, 29: 642 -658.
- DA GAMA, B. A. P.; PEREIRA, R. C.; CARVALHO, A. G. V.; COUTINHO, R.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. **2002**. The effects of seaweed secondary metabolites on biofouling. *Biofouling*, 18: 13–20.
- DALZIEL, B.; BOULDING, E. G. **2005**. Water-borne cues from a shell-crushing predator induce a more massive shell in experimental populations of an intertidal snail. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 317: 25–35.
- DIAS, T.; BRITO, I.; MOUJIR, L.; PAIZ, N.; DARIAS, J.; CUETO, M. **2005**. Cytotoxic sesquiterpenes from *Aplysia dactylomela*. *Journal of natural products*, 68: 1677-1679.
- DÍAZ, E.; GÜLDENZOPH, C.; MOLIS, M.; MCQUAID, C.; WAHL, M. **2006**. Variability in grazer-mediated defensive responses of green and red macroalgae on the south coast of South Africa. *Marine Biology*, 149: 1301–1311.
- DEL MAR PALACIOS, M.; WARREN, D. T.; MCCORMICK, M. I. **2016**. Sensory cues of a top-predator indirectly control a reef fish mesopredator. *Oikos*, 125: 201–209.
- DICKE, M.; SABELIS, M. W. **1988**. Infochemical terminology: based on cost-benefit analysis rather than origin of compounds? *Functional Ecology*, 2: 131 - 139.
- ELVIDGE, C. K.; BROWN, G. E. **2012**. Visual and chemical prey cues as complementary predator attractants in a tropical stream fish assemblage. *International Journal of Zoology*, 2012: 1–7.
- FAULKNER, D. J.; GHISELIN, M. T. **1983**. Chemical defense and evolutionary ecology of dorid nudibranchs and some other opisthobranch gastropods. *Marine ecology progress*, 295-301.
- GINSBURG, D. W.; PAUL, V. J. **2001**. Chemical defenses in the sea hare *Aplysia parvula*: importance of diet and sequestration of algal secondary metabolites. *Marine Ecology Progress Series*, 215: 261–274.
- GRANADO, I.; CABALLERO, P. **1995**. Chemical defense in the seaweed *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. *Scientia Marina*, 59: 31-39.
- HADFIELD, M. G.; PAUL, V. J. **2001**. Natural chemical cues for settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. *Marine chemical ecology*, 431–461, 2001.
- HARIZANI, M.; IOANNOU, E.; ROUSSIS, V. 2016. The Laurencia paradox: An endless source of chemodiversity. In: KINGHORN, A. D.; FALK, H.; GIBBONS, S.; KOBAYASHI, J. 'ICHI

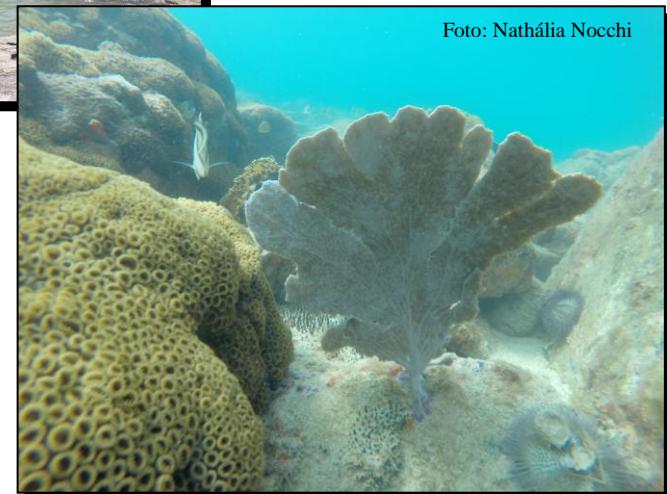
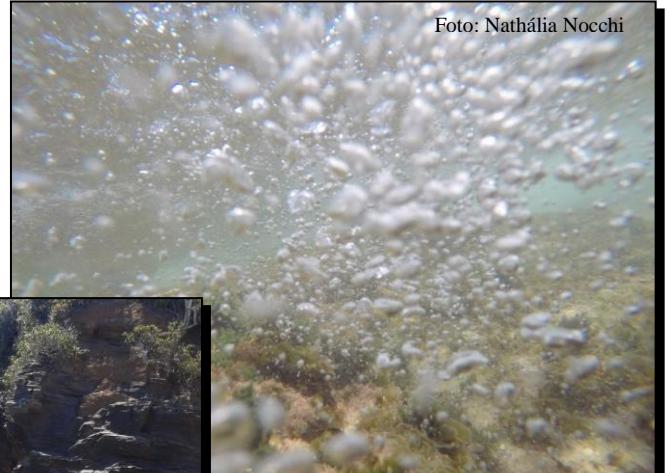
- (Ed.). **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products.** Cham: Springer International Publishing, 102: 91–252.
- HAY, M. E. **1996.** Marine chemical ecology: what's known and what's next? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200: 103–134.
- HAY, M. E. **1992.** The role of seaweed chemical defenses in the evolution of feeding specialization and in the mediation of complex interactions. In: Paul VJ (ed.) *Ecological roles for marine natural products*. Comstock Press, Ithaca, New York, USA, p. 93–118.
- HAY, M. E. **2009.** Marine chemical ecology: chemical signals and cues structure marine populations, communities and ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, 1: 193–212.
- HAY, M. E. **2014.** Challenges and opportunities in marine chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology*, 40: 216–217.
- HAY, M. E.; DUFY, J. E.; PAUL, V. J.; RENAUD, P. E.; FENICAL, W. **1990.** Specialist herbivores reduce their susceptibility to predation by feeding on the chemically defended seaweed *Avrainvillea longicaulis*. *Limnology and Oceanography*, 35: 1734–1743.
- HAY, M. E.; FENICAL, W. **1988.** Marine plant-herbivore interactions: the ecology of chemical defense. *Annual review of ecology and systematics*, 19 (1): 111–145.
- HAY, M. E.; FENICAL, W.; GUSTAFSON, K. **1987.** Chemical defense against Diverse coral-reef herbivores. *Ecology*, 68: 1581–1591.
- HAY, M. E.; RENAUD, P. E.; FENICAL, W. **1988.** Large mobile versus small sedentary herbivores and their resistance to seaweed chemical defenses. *Oecologia*, 75: 246–252.
- HELLIO, C.; BERGE, J. P.; BEAUPOIL, C.; LE GAL, Y.; BOURGOUGNON, N. **2002.** Screening of marine algal extracts for anti-settlement Activities against microalgae and macroalgae. *Biofouling*, 18: 205–215.
- HUGHES, A. R.; ROOKER, K.; MURDOCK, M.; KIMBRO, D. L. **2012.** Predator cue and prey density interactively influence indirect effects on basal resources in intertidal oyster reefs. *PLoS ONE*, 7: e44839.
- IANORA, A.; BENTLEY, M. G.; CALDWELL, G. S.; CASOTTI, R.; CEMBELLA, A. D.; ENGSTRÖM-ÖST, J.; ... PALDAVIČIENĖ, A. **2011.** The relevance of marine chemical ecology to plankton and ecosystem function: an emerging field. *Marine Drugs*, 9: 1625–1648.
- IRELAND, C.; STALLARD, M. O.; FAULKNER, D. J.; FINER, J.; CLARDY, J. **1976.** Some chemical constituents of the digestive gland of the sea hare *Aplysia californica*. *The Journal of Organic Chemistry*, 41: 2461–2465.
- IRIE, T., SUZUKI, M.; HAYAKAWA, Y. **1969.** Isolation of aplysin, debromoaplysin, and aplysinol from *Laurencia okamurae* Yamada. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 42: 843–844.
- JACOBSEN, H. P.; STABELL, O. B. **2004.** Antipredator behaviour mediated by chemical cues: the role of conspecific alarm signalling and predator labelling in the avoidance response of a marine gastropod. *Oikos*, 104: 43–50.
- JI, N.-Y.; WANG, B.-G. **2014.** Nonhalogenated organic molecules from *Laurencia* algae. *Phytochemistry Reviews*, 13: 653–670.
- JOHANNESEN, A.; DUNN, A. M.; MORRELL, L. J. **2014.** Prey aggregation is an effective olfactory predator avoidance strategy. *PeerJ*, 2: e408.
- JOHNSON, P. M. **2006.** Packaging of chemicals in the defensive secretory glands of the sea hare *Aplysia californica*. *Journal of Experimental Biology*, 209: 78–88.

- JOHNSTON, B. R.; MOLIS, M.; SCROSATI, R. A. **2012**. Predator chemical cues affect prey feeding activity differently in juveniles and adults. *Canadian Journal of Zoology*, 90: 128–132.
- JONGARAMRUONG, J.; BLACKMAN, A. J.; SKELTON, B. W. & WHITE, A. H. **2002**. Chemical relationships between the sea hare *Aplysia parvula* and the red seaweed *Laurencia filiformis* from Tasmania. *Australian journal of chemistry*, 55: 275–280.
- KAMIO, M.; DERBY, C. D. **2017**. Finding food: how marine invertebrates use chemical cues to track and select food. *Natural Product Reports*, 34: 514–528.
- KAMIO, M.; GRIMES, T. V.; HUTCHINS, M. H.; VAN DAM, R.; DERBY, C. D. **2010**. The purple pigment aplysioviolin in sea hare ink deters predatory blue crabs through their chemical senses. *Animal Behaviour*, 80: 89–100.
- KANDEL, E. R.; KRIEGSTEIN, A.; SCHACHER, S. **1980**. Development of the central nervous system of *Aplysia* in terms of the differentiation of its specific identifiable cells. *Neuroscience*, 5: 2033–2063.
- KANDEL, N. E. R. **1974**. Metamorphosis of *Aplysia californica* in. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 1: 3654–3658.
- KEPPEL, E.; SCROSATI, R. **2004**. Chemically mediated avoidance of *Hemigrapsus nudus* (Crustacea) by *Littorina scutulata* (Gastropoda): effects of species coexistence and variable cues. *Animal Behaviour*, 68: 915–920.
- KICKLIGHTER, C. E.; DERBY, C. D. **2006**. Multiple components in ink of the sea hare *Aplysia californica* are aversive to the sea anemone *Anthopleura sola*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 334 (2): 256–268.
- KICKLIGHTER, C. E.; GERMANN, M.; KAMIO, M.; DERBY, C. D. **2007**. Molecular identification of alarm cues in the defensive secretions of the sea hare *Aplysia californica*. *Animal Behaviour*, 74: 1481–1492.
- KICKLIGHTER, C. E.; SHABANI, S.; JOHNSON, P. M.; DERBY, C. D. **2005**. Sea hares use novel antipredatory chemical defenses. *Current Biology*, 15: 549–554.
- KITA, M.; KITAMURA, M.; UEMURA, D. **2010**. Pheromones of Marine Invertebrates and Algae. In: *Comprehensive Natural Products II*. [s.l.] Elsevier, p. 263–281.
- KOBAK, J.; RYŃSKA, A. **2014**. Environmental factors affecting behavioural responses of an invasive bivalve to conspecific alarm cues. *Animal Behaviour*, 96: 177–186.
- KOHN, A. J. 1983. Feeding biology of gastropods. *The Mollusca physiology*, (Part 2): 2-64.
- KUPFERMANN, I.; CAREW, T. J. **1974**. Behavior patterns of *Aplysia californica* in its natural environment. *Behavioral Biology*, 12: 317–337.
- KURATA, K.; TANIGUCHI, K.; AGATSUMA, Y.; SUZUKI, M. **1998**. Diterpenoid feeding-deterrents from *Laurencia saitoi*. *Phytochemistry*, 47: 363–369.
- LAPOINTE, B. E.; BARILE, P. J.; YENTSCH, C. S.; LITTLER, M. M.; LITTLER, D. S.; KAKUK, B. **2004**. The relative importance of nutrient enrichment and herbivory on macroalgal communities near Norman's Pond Cay, exumas cays, Bahamas: A “natural” enrichment experiment. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 298: 275–301.
- LINDSEY, J.; LASKER, R. **1974**. Chemical signals in the sea: marine allelochemicals and evolution. *Fishery Bulletin*, 72: 1-11.
- LÖNNSTEDT, O. M.; MCCORMICK, M. I. **2015**. Damsel in distress: captured damselfish prey emit chemical cues that attract secondary predators and improve escape chances. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282 (1818): 2015-2038.

- LÖNNSTEDT, O. M.; MCCORMICK, M. I.; CHIVERS, D. P. **2012**. Well-informed foraging: damage-released chemical cues of injured prey signal quality and size to predators. *Oecologia*, 168: 651–658.
- MACAYA, E. C.; ROTHÄUSLER, E.; THIEL, M.; MOLIS, M.; WAHL, M. **2005**. Induction of defenses and within-alga variation of palatability in two brown algae from the northern-central coast of Chile: effects of mesograzers and UV radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 325: 214–227.
- MANZO, E.; GAVAGNIN, M.; BIFULCO, G.; CIMINO, P.; DI MICCO, S.; CIAVATTA, M. L.; GUO, Y. W.; CIMINO, G. **2007**. Aplysiols A and B, squalene-derived polyethers from the mantle of the sea hare *Aplysia dactylomela*. *Tetrahedron*, 63: 9970–9978.
- MORISHITA, V.; BARRETO, R. **2011**. Black sea urchins evaluate predation risk using chemical signals from a predator and injured con- and heterospecific prey. *Marine Ecology Progress Series*, 435: 173–181.
- NADEAU, L.; PAIGE, J. A.; STARCZAK, V.; CAPO, T.; LAFLER, J.; BIDWELL, J. P. **1989**. Metamorphic competence in *Aplysia californica* Cooper. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 131: 171–193.
- NUSNBAUM, M.; DERBY, C. D. **2010**. Ink secretion protects sea hares by acting on the olfactory and nonolfactory chemical senses of a predatory fish. *Animal Behaviour*, 79: 1067–1076.
- PAUL, V. J.; HAY, M. E. **1986**. Seaweed susceptibility to herbivory: chemical and morphological correlates. *Marine Ecology Progress Series*, 255–264.
- PAVIA, H.; TOTH, G. B. **2000**. Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology*, 81: 3212–3225.
- PAWLIK, J. R. **1989**. Larvae of the sea hare *Aplysia californica* settle and metamorphose on an assortment of macroalgal species. *Marine ecology progress series*. Oldendorf, 51: 195–199.
- PENNINGS, S. C. **1990**. Size-related shifts in herbivory: Specialization in the sea hare *Aplysia californica* Cooper. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 142: 43–61.
- PENNINGS, S. C. **1991**. Spatial and temporal variation in recruitment of *Aplysia californica* Cooper: patterns, mechanisms and consequences. *Journal of experimental marine biology and ecology*, 146: 253–274.
- PEREIRA, R.; ANDRADE, P.; VALENTÃO, P. **2016**. Chemical diversity and biological properties of secondary metabolites from sea hares of *Aplysia* genus. *Marine Drugs*, 14: 1–33.
- PEREIRA, R.C.; DA GAMA B.A.P. **2008**. Macroalgal chemical defenses and their roles in structuring tropical marine communities. In: AMSLER, C.D (Ed). *Algal Chemica Ecology*. Springer, Berlin, 25–55.
- PEREIRA, R. C.; DA GAMA, B. A. P.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y **2003**. Ecological roles of natural products of the brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. *Brazilian Journal of Biology*, 63: 665–672.
- PEREIRA, R. C.; TEIXEIRA, V. L. **1999**. Sesquiterpenos das Algas marinhas *Laurencia* Lamouroux (Ceramiales, Rhodophyta) 1: Significado ecológico. *Química Nova*, 22: 369–374.
- POHNERT, G.; STEINKE, M.; TOLLRIAN, R. **2007**. Chemical cues, defence metabolites and the shaping of pelagic interspecific interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 22: 198–204.
- RASHER, D. B.; STOUT, E. P.; ENGEL, S.; SHEARER, T. L.; KUBANEK, J.; HAY, M. E. **2015**. Marine and terrestrial herbivores display convergent chemical ecology despite 400 million years of independent evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112: 12110–12115.

- RITTSCHOF, D.; COHEN, J. H. **2004**. Crustacean peptide and peptide-like pheromones and kairomones. *Peptides*, 25: 1503–1516.
- ROGERS, C. N.; DE NYS, R.; STEINBERG, P. D. **2002**. Effects of algal diet on the performance and susceptibility to predation of the sea hare *Aplysia parvula*. *Marine Ecology Progress Series*, 236: 241–254.
- ROGERS, C. N.; STEINBERG, P. D.; DE NYS, R. **1995**. Factors associated with oligophagy in two Species of sea hares (Mollusca: Anaspidea). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 192: 47–73.
- ROHDE, S.; MOLIS, M.; WAHL, M. **2004**. Regulation of anti-herbivore defence by *Fucus vesiculosus* in response to various cues. *Journal of Ecology*, 92: 1011–1018.
- ROSEN, E.; SCHWARZ, B.; PALMER, A. R. **2009**. Smelling the difference: hermit crab responses to predatory and nonpredatory crabs. *Animal Behaviour*, 78: 691–695.
- RÜDIGER, W. **1967**. Über Die Abwehrfarbstoffe von *Aplysia*- Arten, I. Aplysioviolin, Ein Neuartiger Gallenfarbstoff. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 348 (Jahresband): 129–138.
- RÜDIGER, W.; CARRA, P. Ó; HEOCHA, C. Ó. **1967**. Structure of phycoerythrobilin and phycocyanobilin. *Nature*, 215: 1477–1478.
- RUSSELL, F. E. **1984**. *Marine toxins and venomous and poisonous marine animals*. London: Academic Press,
- SALEH, N.; SCOTT, A. G.; BRYNING, G. P.; CHITTKA, L. **2007**. Distinguishing signals and cues: bumblebees use general footprints to generate adaptive behaviour at flowers and nest. *Arthropod-Plant Interactions*, 1: 119–127.
- SAVOCA, M. S.; NEVITT, G. A. **2014**. Evidence that dimethyl sulfide facilitates a tritrophic mutualism between marine primary producers and top predators. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111: 4157–4161.
- SCHAUM, C. E.; BATTY, R.; LAST, K. S. **2013**. Smelling danger – alarm cue responses in the polychaete *Nereis* (Hediste) *diversicolor* (Müller, 1776) to potential fish predation. *PLoS ONE*, 8: e77431.
- SELDEN, R.; JOHNSON, A. S.; ELLERS, O. **2009**. Waterborne cues from crabs induce thicker skeletons, smaller gonads and size-specific changes in growth rate in sea urchins. *Marine Biology*, 156: 1057–1071.
- SHEYBANI, A.; NUSNBAUM, M.; CAPRIO, J.; DERBY, C. D. **2009**. Responses of the sea catfish *Ariopsis felis* to chemical defenses from the sea hare *Aplysia californica*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 368: 153–160.
- SIDDON, C. E.; WITMAN, J. D. **2004**. Behavioral indirect interactions: multiple predator effects and prey switching in the rocky subtidal. *Ecology*, 85: 2938–2945.
- STALLARD, M. O.; FAULKNER, D. J. **1974a**. Chemical constituents of the digestive gland of the sea hare *Aplysia californica*—I. Importance of diet. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 49: 25–35.
- STALLARD, M. O.; FAULKNER, D. J. **1974b**. Chemical constituents of the digestive gland of the sea hare *Aplysia californica*—II. Chemical transformations. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 49: 37–41.
- TOTH, G. B. **2007**. Screening for induced herbivore resistance in Swedish intertidal seaweeds. *Marine Biology*, 151: 1597–1604.
- TOTH, G. B.; PAVIA, H. **2007**. Induced herbivore resistance in seaweeds: a meta-analysis. *Journal of Ecology*, 95: 425–434.

- TRUSSELL, G. C.; SMITH, L. D. **2000**. Induced defenses in response to an invading crab predator: an explanation of historical and geographic phenotypic change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 2123–2127.
- VAIRAPPAN, C. S.; ANANGDAN, S. P.; TAN, K. L.; MATSUNAGA, S. **2010**. Role of secondary metabolites as defense chemicals against ice-ice disease bacteria in biofouler at carrageenophyte farms. *Journal of Applied Phycology*, 22: 305–311.
- VICKERS, N. **2000**. Mechanisms of animal navigation in odor plumes. *The Biological Bulletin*, 198: 203–212.
- VOS, M.; VET, L. E.; WÄCKERS, F. L.; MIDDELBURG, J. J.; VAN DER PUTTEN, W. H.; MOOIJ, W. M.; ... VAN DONK, E. **2006**. Infochemicals structure marine, terrestrial and freshwater food webs: Implications for ecological informatics. *Ecological Informatics*, 1: 23–32.
- WÄGELE, H.; KLUSSMANN-KOLB, A. **2005**. Opisthobranchia (Mollusca, Gastropoda)—more than just slimy slugs. Shell reduction and its implications on defence and foraging. *Frontiers in Zoology*, 2: 3.
- WANG, B.-G.; GLOER, J. B.; JI, N.-Y.; ZHAO, J.-C. **2013**. Halogenated organic molecules of rhodomelaceae origin: chemistry and biology. *Chemical Reviews*, 113: 3632–3685.
- WANKE, T.; PHILIPPUS, A. C.; ZATELLI, G. A.; VIEIRA, L. F. O.; LHULLIER, C.; FALKENBERG, M. **2015**. C15 acetogenins from the *Laurencia* Complex: 50 years of research – an overview. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25: 569–587.
- WEBSTER, D. R.; WEISSBURG, M. J. **2009**. The hydrodynamics of chemical cues among aquatic organisms. *Annual Review of Fluid Mechanics*, 41: 73–90.
- WEISSBURG, M. J.; FERNER, M. C.; PISUT, D. P.; SMEE, D. L. **2002**. Ecological consequences of chemically mediated prey perception. *Journal of Chemical Ecology*, 28: 1953–1970.
- WESSELS, M.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. **2000**. New natural product isolation and comparison of the secondary metabolite content of three distinct samples of the sea hare *Aplysia dactylomela* from Tenerife. *Journal of Natural Products*, 63: 920–928.
- WILKINSON, E. B.; GRABOWSKI, J. H.; SHERWOOD, G. D.; YUND, P. O. **2015**. Influence of predator identity on the strength of predator avoidance responses in lobsters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 465: 107–112.
- WINKLER, L. R.; TILTON, B. E. **1962**. Predation on the California sea hare, *Aplysia californica* Cooper, by the solitary great green sea anemone, *Anthopleura xanthogrammica* (Brandt), and the effect of sea hare toxin and acetylcholine on anemone muscle. *Pacific Sciense*, 16: 286–290.
- WYATT, T. D. **2014**. Proteins and peptides as pheromone signals and chemical signatures. *Animal Behaviour*, 97: 273–280.
- YAMAMURA, S.; HIRATA, Y. **1963**. Structures of aplysin and aplysinol, naturally occurring bromo-compounds. *Tetrahedron*, 19: 1485–1496.
- YUN, H. Y.; CRUZ, J.; TREITSCHKE, M.; WAHL, M.; MOLIS, M. **2007**. Testing for the induction of anti-herbivory defences in four Portuguese macroalgae by direct and water-borne cues of grazing amphipods. *Helgoland Marine Research*, 61: 203–209.
- YUN, H. Y.; ENGELEN, A. H.; SANTOS, R. O.; MOLIS, M. **2012**. Water-borne cues of a non-indigenous seaweed mediate grazer-deterrant responses in native seaweeds, but not vice versa. *PLoS ONE*, 7: e38804.
- ZIMMER, R. K.; BUTMAN, C. A. **2000**. Chemical signaling processes in the marine environment. *The Biological Bulletin*, 198: 168–187.



## HIPÓTESE E OBJETIVOS

---

## HIPÓTESE

Com base na importância da sinalização química no ambiente marinho e a associação de herbívoros como o gênero *Aplysia* com macroalgas do gênero *Laurencia*, acredita-se que a associação desses organismos esteja baseada na estreita comunicação mediada por substâncias exsudadas na água, especificamente no que diz respeito à localização da alga pelo herbívoro, e consequentemente, mediante a presão da atividade desse herbívoro, a comunicação intraespecífica entre indivíduos de macroalgas. Assim, esse trabalho buscou testar duas hipóteses, levando em consideração o metabolismo secundário da macroalga como veículo de transferência de informações:

- 1) *Laurencia dendroidea* emite na água substâncias que são detectadas por *Aplysia brasiliiana* e que auxiliam na sua orientação para sua alga hospedeira.
- 2) Indivíduos de *L. dendroidea* pastadas por *A. brasiliiana* emitem pistas químicas que são recebidas por vizinhos coespecíficos ilesos que, por sua vez, aumentam a produção de substâncias de defesa contra a herbivoria por *A. brasiliiana*.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Investigar a presença de pistas químicas envolvidas na interação biológica entre a macroalga *Laurencia dendroidea* e o molusco *Aplysia brasiliiana*.

### Objetivos específicos

- Isolar e elucidar os metabólitos secundários produzidos por *L. dendroidea*;
- Caracterizar as substâncias exsudadas em água do mar por *L. dendroidea*;
- Investigar como o molusco *A. brasiliiana* responde aos metabólitos de *L. dendroidea* em bioensaios em laboratório;
- Avaliar a indução de defesas químicas contra a herbivoria e as alterações do metabolismo secundário em indivíduos de *L. dendroidea* expostos ao consumo direto por *A. brasiliiana*; e em indivíduos ilesos expostos a pistas químicas liberadas na água por coespecíficos de *L. dendroidea* predados e pela presença do herbívoro.
- Determinar o tempo de indução de defesas químicas.



## CAPÍTULO II

---

# Isolamento e caracterização de metabólitos secundários de *Laurencia dendroidea*

## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Laurencia dendroidea*

### **II. 1. INTRODUÇÃO**

A natureza, sem dúvidas, é uma fonte prolífica de diversidade química, e, por muitos anos a Flora e a Fauna terrestres foram um dos principais reservatórios de promissorres produtos bioativos na química de produtos naturais (DIAS *et al.*, 2012). Entretanto, o ambiente marinho, que cobre aproximadamente 70% da superfície terrestre e abriga representantes de 34 dentre os 36 filos descrito; alguns dos quais só são encontrados nos oceanos (MORA *et al.*, 2011), oferece um enorme recurso para a descoberta de novas e promissoras estruturas químicas (BLUNT *et al.*, 2017). A química de produtos naturais marinhos, juntamente com a ecologia química marinha, teve um crescente avanço nas últimas décadas, sustentado por: desenvolvimento de técnicas e equipamentos de mergulho seguros, novas ferramentas analíticas para o isolamento e caracterização de substâncias e novas técnicas de bioensaios ecológicos. A biota marinha e seus metabólitos, em grande parte inexplorados, tornaram-se acessível aos biólogos marinhos e químicos orgânicos, e o número de organismos investigações aumentou exponencialmente nos últimos 60 anos (PAWLICK *et al.*, 2013). Desde então, já foram isoladas mais de 27.000 substâncias de organismos marinhos como: microorganismos; macroalgas verdes, marrons e vermelhas; esponjas; cnidários; briozoários; moluscos; tunicados; corais e equinodermos (BLUNT *et al.*, 2017).

Os produtos naturais marinhos incluem diversas classes de substâncias, tais como terpenos, fenois, polifenólicos, acetogeninas, alcaloides e outros (BLUNT *et al.*, 2017). A maioria das pesquisas sobre produtos naturais marinhos se concentra em seus potenciais bioativos no desenvolvimento de fármacos com comprovadas atividades antitumorais (MUDIT & EL SAYED, 2016), antivirais (GOGINENI *et al.*, 2015), anti-inflamatórias (FERNANDO *et al.*, 2016), antifúngicas (EL-HOSSARY *et al.*, 2017), antimicrobianas (MOLONEY, 2016) e antioxidante (MARTINS *et al.*, 2013). Algumas substâncias de origem marinha estão, atualmente, em testes clínicos para estabelecer sua eficácia como novos fármacos ou já se encontram em uso clínico (NEWMAN & CRAGG, 2014; RANGEL & FALKENBERG, 2015; MUDIT & EL SAYED, 2016), como a trabectedina ou ET-743

comercialmente chamado de Yondelis®, a brentuximab vedotina ou SGN-35 (Adcetris®), a plitidepsina (Aplidin®) e tetrodotoxina (Tectin®).

Entretanto, tais substâncias não se originaram na natureza para uso humano em primeiro lugar. Essencialmente, os metabólitos secundários desempenham um papel proeminente para a sobrevivência dos organismos produtores. Há muitas teorias a respeito dos fatores que levaram os organismos marinhos e terrestres a produzirem estas substâncias. As primeiras teorias sustentam que esses produtos se tratavam de resíduos químicos do metabolismo primário e, por isso, o termo metabólitos secundários foi cunhado, uma vez que estes metabólitos não foram considerados importantes para o organismo produtor. No entanto, tais substâncias são agora consideradas de importância vital para o organismo produtor e uma nova disciplina chamada ecologia química, uma área multidisciplinar envolvendo químicos, biólogos, ecólogos e bioquímicos, se dedica ao estudo das funções ecológicas destas substâncias (HASLAM, 1994; BERENBAUM, 1995; CHRISTOPHERSEN, 1995; HAY, 1996; BOURGAUD *et al.*, 2001; FIRN & JONES, 2009). Uma vez que os organismos, entre eles os marinhos, são expostos a uma variedade de habitats e a condições adversas tais como intensa pressão competitiva por espaço, luz e nutrientes, os mesmos desenvolveram numerosas e complexas defesas químicas para garantir sua aptidão e sobrevivência (HAY & FENICAL, 1996). Contudo, das diversas substâncias bioativas conhecidas de origem marinha, apenas uma pequena parte, predominantemente os metabólitos majoritários ou misturas complexas, foi estudada por sua importância ecológica. Estes poucos estudos evidenciaram seu papel como toxinas, muitas prejudiciais à saúde humana (REVERTÉ *et al.*, 2014), como substâncias de defesa que diminuem a atratividade e palatabilidade de herbívoros e predadores (GARSON, 2010; PAWLICK, 2012), como proteção contra estressores abióticos como a radiação (HÄDER *et al.*, 2015), atuação como sinalizadores químicos em interações ecológicas intra- e interespecíficos (HAY, 2009) e na prevenção de incrustações (DA GAMA *et al.*, 2014).

Dentre os metabólitos de organismos marinhos, aqueles isolados de macroalgas já foram o principal alvo de estudos sobre química de produtos naturais marinhos. Até o final da década de 80, aproximadamente 35% das novas substâncias de origem marinha isoladas foram provenientes de macroalgas (SMIT, 2004; PAL *et al.*, 2014; ANAND *et al.*, 2016). Macroalga marinha é um termo que engloba algas marinhas macroscópicas, eucariontes, bentônicas e fotossintetizantes. E, entre os organismos marinhos, as macroalgas representam um grande grupo de organismos importantes na estruturação do ecossistema por fazerem parte

da base da cadeia alimentar. As macroalgas são divididas em três filos: Rhodophyta (algas vermelhas), Ochrophyta (algas pardas) e Chlorophyta (algas verdes) (GUIRY & GUIRY, 2017). Dos três filos, as macroalgas vermelhas destacam-se pela abundância, diversidade de espécies e pelo elevado número de metabólitos secundários (WANG *et al.*, 2013; WANKE *et al.*, 2015; HARIZANI *et al.*, 2016).

A maior fonte de diversidade e de metabólitos secundários dentre as macroalgas vermelhas é, indiscutivelmente, proveniente da família Rhodomelaceae (ordem Ceramiales, classe Rhodophyceae e phylum Rhodophyta), com cerca de 170 gêneros e um pouco mais de 1000 espécies reconhecidas, distribuídas em mares tropicais e subtropicais de todo mundo nas regiões entre marés e infralitorâneas em profundidades de até 65 m (GUIRY & GUIRY, 2017). Destaca-se nesta família o gênero *Laurencia*, onde suas espécies estão agrupadas, em termos taxonômicos, com as espécies dos gêneros *Laurenciella*, *Osmundea*, *Chondrophycus*, *Palisada* e *Yuzurua*, no complexo conhecido como “complexo *Laurencia*” (CASSANO *et al.*, 2012). No Brasil, o “complexo *Laurencia*” é representado por vinte taxa: *Laurencia strictu sensu*, com doze espécies, *Palisada* com quatro espécies e *Osmundea* e *Yuzurua* com duas espécies cada, distribuídas ao longo de toda a costa, desde o Ceará até o Rio Grande do Sul, constituindo um elemento ecológico importante da flora marinha brasileira (FUJII *et al.*, 2011). Até o momento mais de 1.000 substâncias já foram isoladas de diferentes espécies de *Laurencia*, dentre elas sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, acetogeninas, alcaloides indolícos, esteroides, onde muito destes metabólitos são halogenados (HARIZANI *et al.*, 2016).

Os metabólitos das espécies de *Laurencia*, além de possuírem características estruturais únicas, também exibem interessantes e notáveis propriedades biológicas e ecológicas. O potencial uso dos metabólitos secundários de espécies de *Laurencia* vem sendo bem documentado e exibem diversas atividades biológicas, tais como antitumoral (ILIOPOULOU *et al.*, 2003; LHULLIER *et al.*, 2009b; DU *et al.*, 2010; PACHECO *et al.*, 2011; STEIN *et al.*, 2011a; DELLAII *et al.*, 2013; ZALETA-PINET *et al.*, 2014; ALARIF *et al.*, 2016), antimicrobianos (HIGGS, 1981; VAIRAPPAN, 2003; VAIRAPPAN *et al.*, 2001, 2010; MACHADO *et al.*, 2011; ALARIF *et al.*, 2012; BIANCO *et al.*, 2013, 2015; MACHADO *et al.*, 2014; ABDEL-RAOUF *et al.*, 2015; KAVITA *et al.*, 2014; LI *et al.*, 2016), inibidores enzimáticos (CHATTER *et al.*, 2011; VAIRAPPAN *et al.*, 2013; MACHADO *et al.*, 2014; WIJESINGHE *et al.*, 2014; BIANCO *et al.*, 2015; LAJILI *et al.*, 2016), anti-helmínticos (DAVYT *et al.*, 2001, 2006), analgésicos (CHATTER *et al.*, 2009;

LAJILI *et al.*, 2016), anti-asmático (JUNG *et al.*, 2009), antifúngico (SHUI-CHUN & YUEWEI, 2010; STEIN *et al.*, 2011b; LI *et al.*, 2012b; YU *et al.*, 2014; FENG *et al.*, 2015; ALARIF *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2017), antimalárico (WRIGHT *et al.*, 1996; TOPCU *et al.*, 2003; MENDIOLA MARTÍNEZ *et al.*, 2005), antiprotozoário (FREILE-PELEGRIN *et al.*, 2008; VEIGA-SANTOS *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2011; DESOTI *et al.*, 2012, 2014), antiviral (SOARES *et al.*, 2012; PÉREZ-RIVEROL *et al.*, 2014; GHEDA *et al.* 2016) e antioxidantes (LIANG *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2010; LEE *et al.*, 2011).

Por sua vez, essas mesmas substâncias de *Laurencia*, com alto potencial biotecnológico, apresentam importantes e relevantes funções do ponto de vista ecológico. E, apesar de menos comuns, os trabalhos na área de ecologia química marinha demonstram que tais metabólitos podem atuar como agentes anti-incrustantes, impedindo o assentamento de organismos bentônicos (DE NYS *et al.*, 1996; KÖNIG; WRIGHT, 1997; DA GAMA *et al.*, 2002, 2003; PEREIRA *et al.*, 2003; UMEZAWA *et al.*, 2014; CEN-PACHECO *et al.*, 2015) e agentes alelopáticos, impedindo o crescimento de macroalgas, microalgas e bactérias marinhas (HELLIO *et al.*, 2002; VAIRAPPAN *et al.*, 2010). Entre as funções ecológicas mais estudadas para as substâncias de *Laurencia* está a defesa química contra diversos herbívoros marinhos. Esses metabólitos são capazes de inibir o consumo de anfípoda da espécie *Schizaphis graminum* (ARGANDOÑA *et al.* 1993), de indivíduos jovens do molusco *Huliotis discus hannai* e dos ouriços-do-mar (*Strongylocentrotus nudus* e *S. intermedius*) (KURATA *et al.*, 1998), de espécies de gastrópodes como *Littorina strata* e *Osilinus atratus* (GRANADO & CABALLERO, 1995), de peixes recifais (PAUL & HAY, 1986; HAY *et al.*, 1987), de ouriços *Diadema antillarum* e *Lytechinus variegatus* adultos (HAY *et al.*, 1987; PEREIRA *et al.*, 2003) e de caranguejos da espécie *Pachygrapsus transversus* (PEREIRA *et al.*, 2003).

Outro aspecto ressaltado para os metabólitos de *Laurencia* é sua utilização como marcadores quimiotaxonômicos do “complexo *Laurencia*”. Uma vez que o alto grau de variação fenotípica e características morfológicas tornam a discriminação de espécies dentro do “complexo *Laurencia*” extremamente difícil quando se utiliza apenas caracteres tradicionais (FENICAL & NORRIS, 1975; HOWARD *et al.*, 1980; MASUDA *et al.*, 1996, 1997, 1998; TAKAHASHI *et al.*, 1998; MASUDA *et al.*, 1999; RETZ DE CARVALHO & FRANCA ROQUE, 2004; KAMENARSKA *et al.*, 2006; LEE TAN *et al.*, 2011; JI *et al.*, 2016), os metabólitos secundários característicos de espécies de *Laurencia* são uma ferramenta taxonômica útil na sua identificação, pois sua produção não é aleatória e sim uma

característica determinada pelo genoma e enzimas específicas de espécies do gênero (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012, 2015; VERBRUGGEN & COSTA, 2015; CALEGARIO *et al.*, 2016).

Apesar de metabólitos característicos terem sido descritos em espécies do gênero *Laurencia* com reconhecidas atividades biológica, ecológica e quimiotaxonômica, poucos estudos levaram em consideração a existência da variabilidade natural na produção dessas substâncias nestes tipos de trabalho (STENGEL *et al.*, 2011). Entretanto, estudos pontuais já apontaram a variabilidade natural na composição química dos metabólitos secundários de *L. dendroidea* ao longo do dia (SUDATTI *et al.*, 2016), em nível intra- e interpopulacional (OLIVEIRA *et al.*, 2013), entre seus órgãos reprodutivos e vegetativos (SUDATTI *et al.*, 2006), por influência de fatores abióticos (SUDATTI *et al.*, 2011) e geográficos (LEE TAN *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2016), mostrando a importância desse tipo de abordagem nos estudos farmacológicos e, principalmente, nos estudos quimiotaxônicos e ecológicos.

Embora a pesquisa de produtos naturais de *Laurencia* tenha sido uma área de pesquisa ativa desde o início da década de 70 (SIMS *et al.*, 1971), estruturas químicas interessantes ainda estão sendo descritas continuamente, com esqueletos carbônicos novos, não observados em outros organismos e com potenciais atividades biológicas e ecológicas (ALARIF *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2016; GUTIÉRREZ-CEPEDA *et al.*, 2016; JI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016a, 2016b; YU *et al.*, 2017). Este fato desperta o interesse contínuo de químicos e biólogos no isolamento, caracterização e reconhecimento das atividades biológicas e ecológicas dos metabólitos deste gênero.

Na busca por tentativa de identificar os metabólitos envolvidos na mediação química entre *Laurencia dendroidea* e *Aplysia brasiliiana*, foram isolados e caracterizados metabólitos secundários produzidos por *L. dendroidea* para a realização dos ensaios de laboratório e estudos cromatográficos de perfis químicos visando evidenciar esta mediação.

## **II. 2. PARTE EXPERIMENTAL**

### **II.2.1. Coleta dos organismos**

Indivíduos de *Laurencia dendroidea* foram coletados através de técnicas de mergulho livre na Praia Azeda no município de Armação dos Búzios - Rio de Janeiro ( $22^{\circ} 44' 33,66''S$

41° 52' 55,57"O) em 21/09/2014 e na Praia de Manguinhos no município de Serra – Espírito Santo (20° 11' 13,9" S 040° 11' 25,4" O), em 19/03/2010. Ambas as populações estavam na profundidade máxima de 2m. Após a coleta, o material foi triado para remoção de epífitas e fauna acompanhante. O material proveniente da Praia de Manguinho, antes de ser submetido ao processo de extração, foi congelado a -20°C, enquanto o material da Praia Azeda foi submetido a extração imediatamente após a coleta.

A identificação das macroalgas foi realizada pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lísia Mônica Gustinari (NUPEM/UFRJ) e as exsicatas de todo o material botânico (número de catálogo de espécimes-testemunho da Praia Azeda= RFA 38846 e da Praia de Maguinho= RFA 35887) foram depositadas no Herbário RFA da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

## II.2.2. Procedimentos gerais

A atividade ótica foi mensurada usando um polarímetro PERKIN-ELMER®, modelo 241, medida a 20 °C, usando a linha D do sódio ( $\lambda=589$  nm) e uma célula de 1dm de longitude óptica. As substâncias foram diluídas em clorofórmio ( $\text{CHCl}_3$  grau HPLC) e metanol (MeOH grau HPLC). Os espectros de ressonância magnética nuclear 1D e 2D ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , APT, COSY, HSQC-DEPT, HMBC) foram obtidos no Instituto Universitario de Bio-Orgánica Antonio González (Universidad de la Laguna - ULL, Espanha) usando o aparelho modelo BRUKER® AVANCE 600 MHz e no Laboratório Multusuário de RMN (Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense) usando os aparelhos modelos Varian VNMRS 500 MHz e 300MHz. As amostras foram diluídas em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) em tubos de 5mm para amostras com massa acima de 1 mg e tubos de 3mm para amostras com massas inferiores a 1 mg. Os deslocamentos químicos foram padronizados usando o sinal do  $\text{CHCl}_3$  residual a 7,26 ppm como referência interna. Os dados foram processados e analisados usando os softwares MestReNova, TopSpin 3.2 e SpinWorks 4. Os espectros de massas por ionização por impacto de elétrons (EM-IE) foram obtidos no Laboratório Integrado de Química (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, campus Macaé) utilizando um GCMSQP-2010 Plus (70 eV) da Shimadzu; em  $m/z$  (rel. %). Os espectros de massas de alta resolução por eletrospray foram obtidos em Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ULL, Espanha) utilizando um VG-Autospec FISONS.

O processo de fracionamento dos metabólitos secundários dos extratos de *L. dendroidea* da Praia Azeda foi realizado no Laboratório de Productos Naturales Marinos (ULL), sob supervisão dos professores Dr. Manuel Norte, Dr. José Javier Fernández e Dra. Maria Luisa Souto. Já o isolamento dos metabólitos secundários do extrato de *L. dendroidea* da Praia de Manguinhos foi realizado no Grupo de Produtos Naturais de Organismos Aquáticos (GPNOA, UFRJ, campus Macaé) sob a supervisão da professora Dra. Angélica Ribeiro Soares. As separações foram realizadas em colunas com fase estacionária de Sephadex LH-20 (6 x 34 cm, PHARMACIA FINE CHEMICALS®), colunas de média pressão pré-empacotada Lobar LiChroprep com fase estacionária de Sílica (Si-60, 40-63 µm, MERCK®), colunas de vidro com fase estacionária de sílica *Silicycle* Sílicaflash F60 (230 – 400 mesh MERCK®); as cromatografias em camada delgada (CCD) foram realizadas em placas de sílica gel 60 GF<sub>254</sub> nm (MERCK®); e a detecção dos metabólitos foi realizada, inicialmente, por inspeção em câmara de UV a 254 e 365nm, seguida como sistema reavaliador universal foi borrifado uma solução de sulfato cérico 2% em ácido sulfúrico. As separações por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas utilizando aparelho modelo Pharmacia LKB 2252 com detector de índice de refração RI-Shodex-102 e coluna de fase normal de sílica ( $\mu$ -Porasil™, 125 Å, 1.9 x 15 cm). A centrifuga J.P. Selecta Centrosix foi utilizada como estratégia de separação por precipitação em algumas etapas do isolamento.

### II.2.3. Extração

Para extração dos metabólitos secundários de *L. dendroidea* coletada na Praia Azeda em Búzios (RJ), 450g de indivíduos frescos foram submetidos à extração sequencial por maceração utilizando acetato de etila:metanol (1:1) e álcool etílico:água destilada (1:1). Foram realizadas duas extrações de 24h cada para cada mistura de solvente. O procedimento de extração para os indivíduos coletados na Praia de Manguinhos (ES) foi descrito em MACHADO, 2014; onde inicialmente foram secos em temperatura ambiente e, em seguida triturados e submetidos a três extrações por maceração de 24h cada com diclorometano. Em todas as extrações (de ambos os materiais) foi utilizado um banho de ultrassom (marca Logen Scientifica) por 15 minutos. Após filtração todos os extratos brutos foram concentrados sob pressão reduzida com o auxílio de um evaporador rotatório. Ao final obteve-se um material oleoso de tonalidades verde para cada um dos extratos.

#### **II.2.4. Isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos secundários**

Inicialmente, o extrato em acetato de etila:metanol de *L. dendroidea* da Praia Azeda (2,0g) foi diluído em *n*-Hexano:CHCl<sub>3</sub>:MeOH (2:1:1) e a parte solúvel (1,4g) foi submetida a cromatografia por exclusão molecular com Sephadex LH-20 (6 x 34 cm) eluída com mistura de *n*-hexano:CHCl<sub>3</sub>:MeOH (2:1:1). Foram coletadas 115 frações de 25 mL e, a partir da similaridade por CCD, foram reunidas em 7 frações (1AZ-FR1 a FR7). Inicialmente, como estratégia para o prosseguimento do fracionamento deste extrato, as frações 1AZ-FR1 a FR7 foram analisadas por RMN <sup>1</sup>H. A partir da observação de sinais característicos de sesquiterpenos halogenados, compreendidos entre as regiões 4 a 6 ppm no RMN <sup>1</sup>H, a fração 1AZ-FR4 (183mg) foi escolhida para o prosseguimento de purificação. Primeiramente, a fração foi filtrada em filtro de fluoreto de polivinilideno (PVDF) de 0,22µm e submetida a uma nova separação em uma coluna pré-empacotada de media pressão de Sílica (Si-60, 40-63 µm), utilizando-se um gradiente hexano-acetato de etila fornecendo um total de 137 frações de 15mL. As frações com perfil similar por CCD foram reunidas, resultando em 12 frações (2AZ-FR1 a FR12) e, entre elas, foi possível isolar e elucidar as **substâncias 1** (120,5 mg; 2AZ-FR5; hexano: acetato de etila 9:1) e **2** (1,5 mg; 2AZ-FR4; hexano: acetato de etila 9,5:0,5). A purificação final das frações 2AZ-FR6 (hexano: acetato de etila 8:1) e 2AZ-FR7 (hexano: acetato de etila 7:3) foi realizada com auxilio de CLAE com coluna de sílica ( $\mu$ -Porasil<sup>TM</sup>, 125 Å, 1,9 x 15 cm). Para a fração 2AZ-FR7 (4,8 mg) foi empregado um sistema isocrático de *n*-hexano: acetato de etila (9:1) de 1mL/min onde obteve-se as **substâncias 3** (520 µg; 3AZ-FR2; tempo de retenção= 35 min) e **4** (1,4mg; 3AZ-FR4, tempo de retenção= 44 min). Já para a fração 2AZ-FR6 (7 mg) foi empregado um gradiente *n*-hexano: acetato de etila onde foi possível se obter a **substância 5** (2,7 mg; 4AZ-FR2; 9,5:05, tempo de retenção= 20 min).

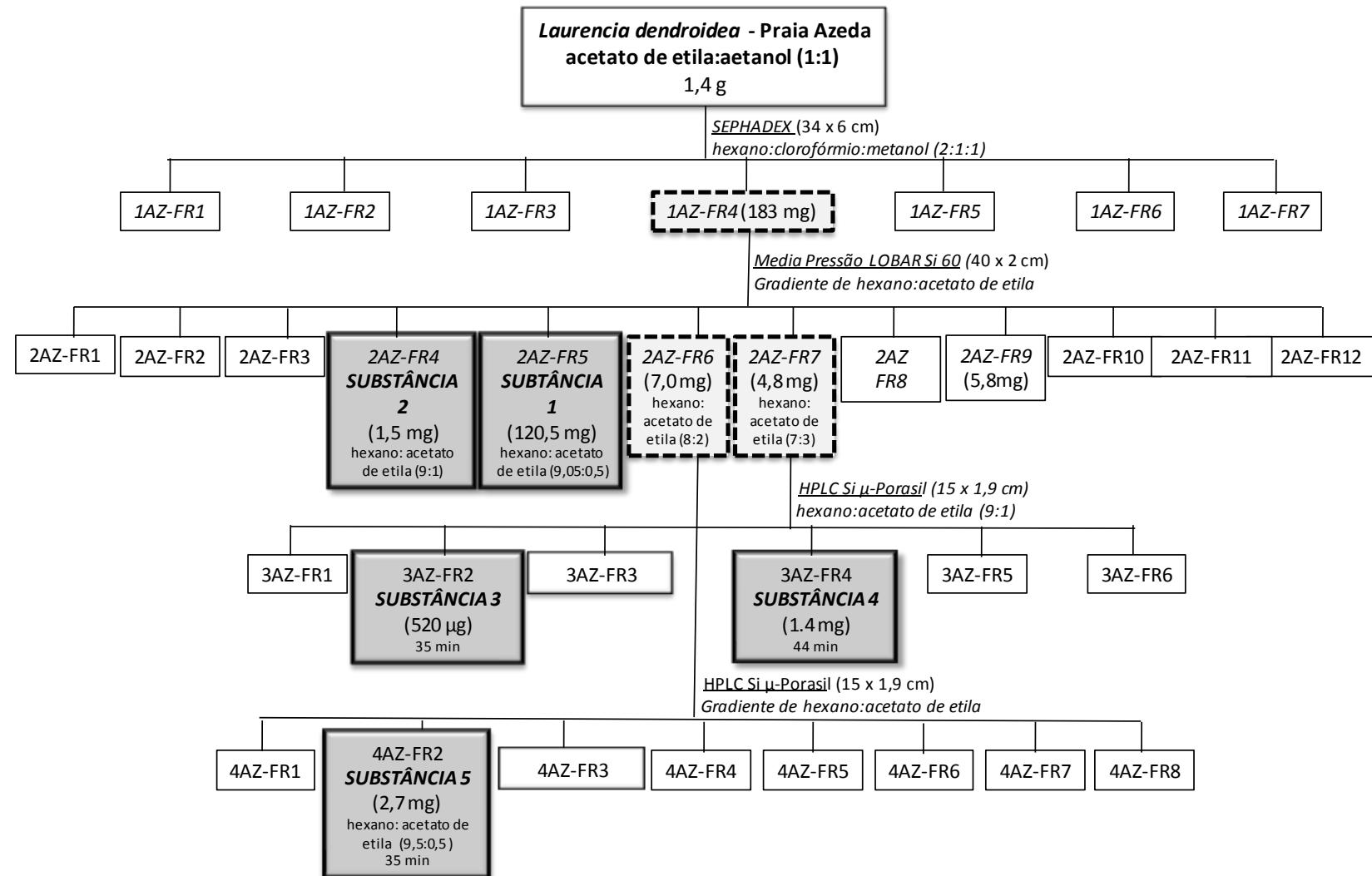
A Figura II.1 resume as etapas empregadas no fracionamento do extrato bruto em acetato de etila:metanol (1:1) de *L. dendroidea* da Praia Azeda.

Posteriormente, o extrato obtido em etanol:água (1,5g) obtido a partir da extração sequencial dos indivíduos de *L. dendroidea* da Praia Azeda (Búzios-RJ) foi submetido a cromatografia por exclusão molecular com Sephadex LH-20 (6 x 25 cm) eluída com metanol, gerando 96 frações, onde após a reunião por similaridade por CCD foram obtidas 11 frações (5AZ-FR1 a FR11). Em seguida, as frações 5AZ-FR6 (204 mg) foram submetidas à separação por precipitação, onde 10 mL de diclorometano foi adicionado a fração e submetido a

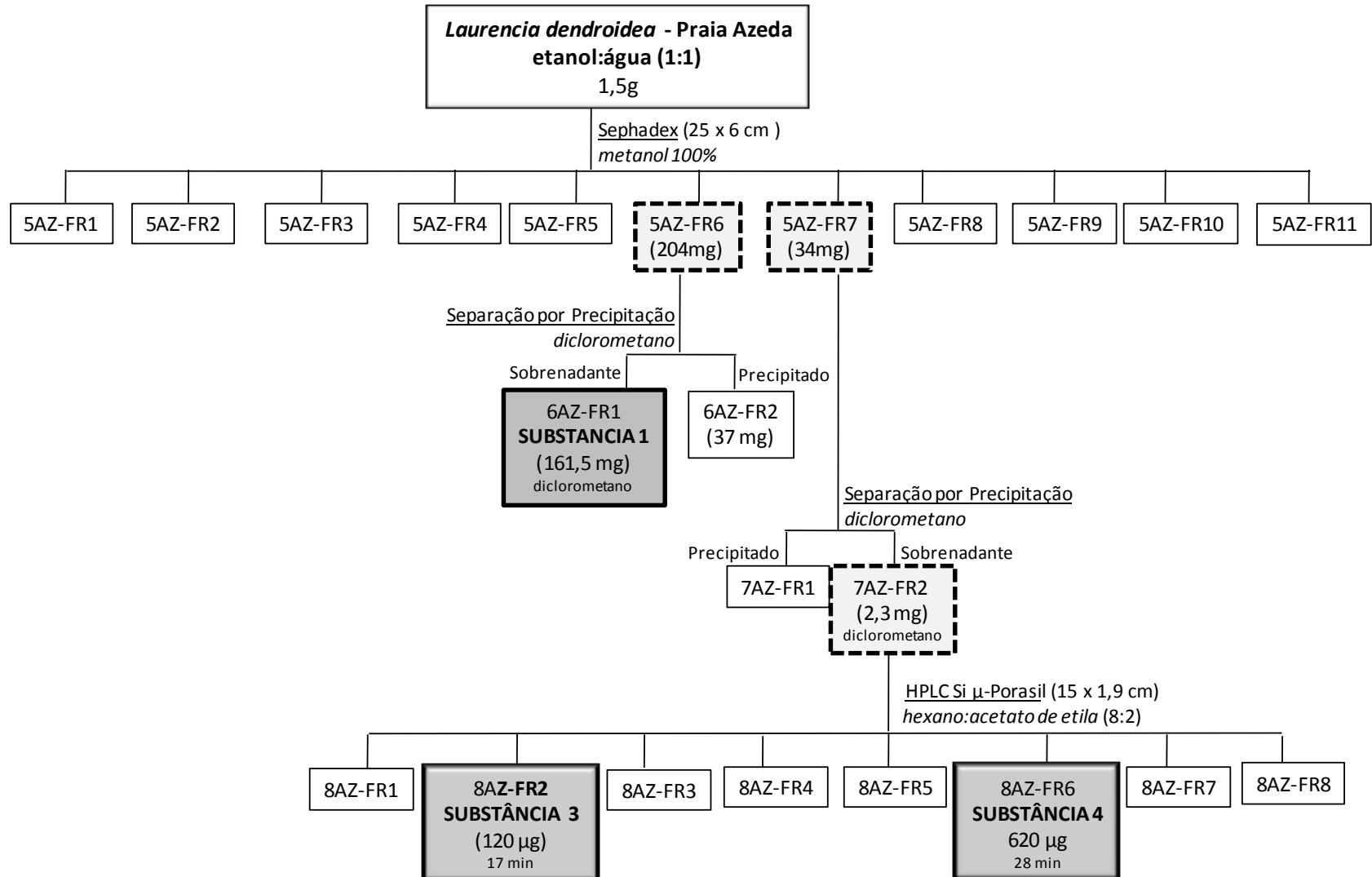
centrifugação por 20 min. Esse procedimento foi repetido por 3 vezes, resultando novamente no isolamento da **substância 1** (161,5mg, 6AZ-FR1 – sobrenadante). O mesmo procedimento de separação por precipitação foi realizado com a fração 5AZ-FR7 (34 mg), onde a fração superior (2,3 mg; 9AZ-FR2, sobrenadante), logo em seguida foi submetida a purificação por CLAE com coluna de sílica ( $\mu$ -Porasil<sup>TM</sup>, 125 Å, 1.9 x 15 cm) usando um sistema isocrático em *n*- hexano/EtOAc 8:2, permitindo novamente o isolamento das **substâncias 3** (120  $\mu$ g; tempo de retenção = 17 min) e **4** (620 $\mu$ g, tempo de retenção = 28 min).

A Figura II.2 resume as etapas empregadas no fracionamento do extrato bruto em etanol:água (1:1) de *L. dendroidea* da Praia Azeda.

Por sua vez, o extrato de *L. dendroidea* da Praia de Manguinhos, obtido em diclorometano (2,0 g), foi inicialmente fracionado por cromatografia em coluna (CC) de sílica (30,2 g de Sílica flash *Silicycle* F60 230-400 mesh, 1,5 x 30 cm), e eluída em um sistema de gradiente utilizando como solventes misturas crescentes de polaridade de *n*-hexano:diclorometano (100:0, 95:5, 90:10, 75:25, 50:50, 0:100), diclorometano: acetato de etila (50:50, 0:100) e metanol (100) com volume de 75 mL para cada sistema. Foram coletadas 46 frações que foram renuidas por similaridade evidenciada por CCD em 14 frações (1MANG-FR1 a F14), e, entre as frações iniciais foi possível identificar as **substâncias 7 e 8**, em mistura (11,6 mg; 1MANG-FR8, hexano:diclorometano 7,5:2,5) e isolar a **substância 9** (2,3 mg; 1MANG-FR7, hexano:diclorometano 9:1).



**Figura II. 1.** Fracionamento do extrato bruto de *L. dendroidea* em acetato de etila: metanol (1:1) da Praia Azeda (Búzios-RJ)



**Figura II.2.** Fracionamento do extrato bruto de *L. dendroidea* em etanol:água (1:1) da Praia Azeda (Búzios-RJ)

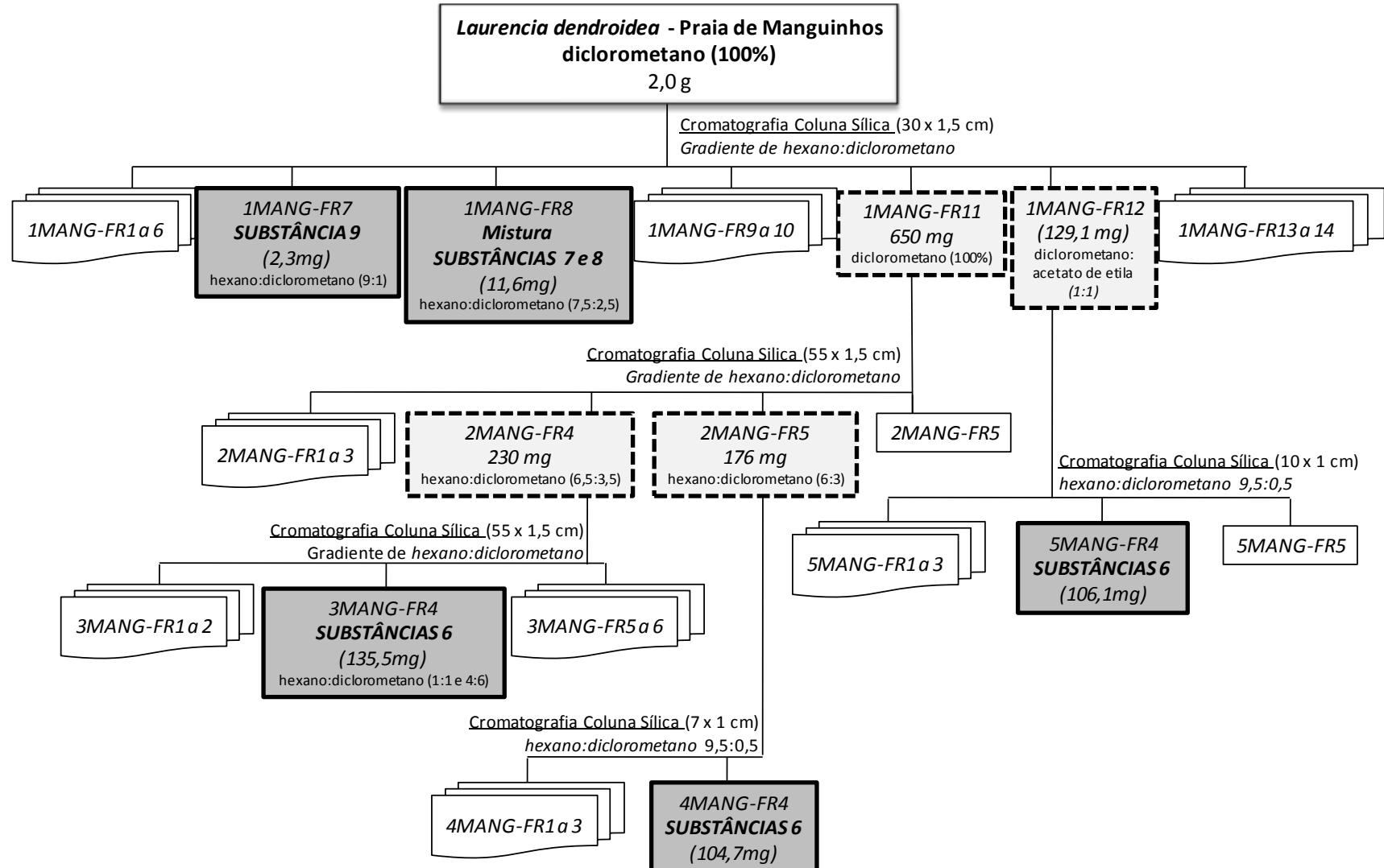
A fração 1MANG-FR11 (650 mg; diclorometano 100%) foi submetida a uma nova separação por CC de sílica (45g, Sílica flash *Silicycle* F60 230-400 mesh, 1,5 x 55 cm) em um sistema de gradiente hexano:diclorometano [100:0, 95:5, 90:10 (140mL cada), 75:25 (200 mL), 50:50 (150mL), 65:35 (200 mL), 0:100 (150 mL)], diclorometano: acetato de etila [50:50 (100mL), 0:100 (100mL)]. O fracionamento resultou na separação de 77 frações, reunidas em 6 frações de acordo com o perfil verificado por CCD (2MANG-FR1 a FR7). Em seguida, a fração 2MANG-FR4 (230 mg; hexano:diclorometano 6,5:3,5) foi submetida a um novo fracionamento por CC de sílica (5,7 g, *Silicycle Siliaflash* F60 230-400 mesh, 1,0 x 10 cm) com hexano:diclorometano [70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 0:100 (100mL de cada)]. As frações similares em CCD foram reunidas em 5 frações (3MANG-FR1 a FR5). A **substância 6** (135,5 mg) foi obtida na fração 3MANG-FR3 (hexano:diclorometano 50:50 e 40:60).

A fração 2MANG-FR5 (176 mg; hexano:diclorometano 6:3) foi purificada por CC de sílica (4,2 g, *Silicycle Siliaflash* F60 230-400 mesh, 1,0 x 7,0 cm) em um sistema isocrático com 50mL de *n*-hexano:acetato de etila (95:5). No total, foram obtidas 4 frações (4MANG-FR1 a FR4) que foram reunidas por similaridade em CCD. A **substância 6** (104,7mg) foi obtida na fração 4MANG-FR4.

Finalmente, a fração 1MANG-FR12 (129,1 mg; diclorometano:acetato de etila 50:50) foi submetida a um novo fracionamento em CC de sílica (6 g, *Silicycle Siliaflash* F60 230-400 mesh, 1,0 x 10 cm), utilizando um sistema isocrático com 75mL de hexano:acetato de etila (95:5). Cinco frações (5MANG-FR1 a 5) foram obtidas após a runião por similaridade por CCD. A **substância 6** (106,1mg) foi obtida na fração 5MANG-FR4.

A Figura II.3 resume as etapas empregadas no fracionamento do extrato bruto em diclorometano (100%) de *L. dendroidea* da Praia de Manguinhos.

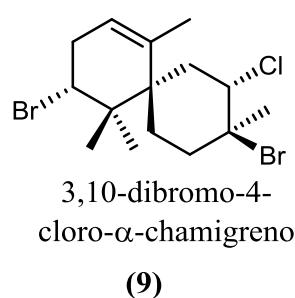
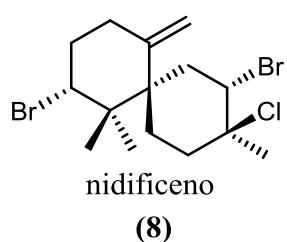
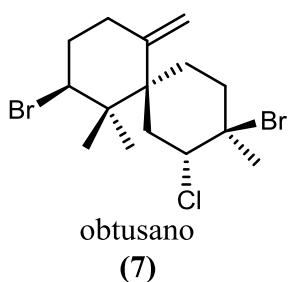
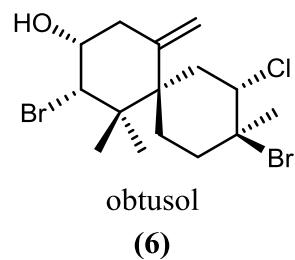
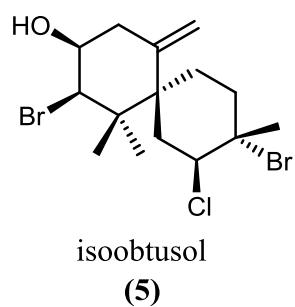
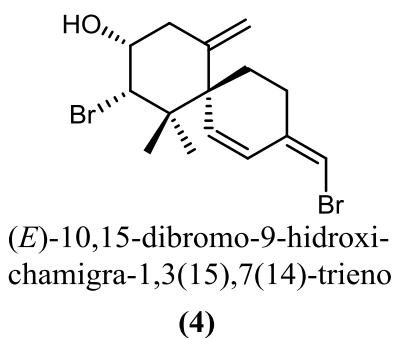
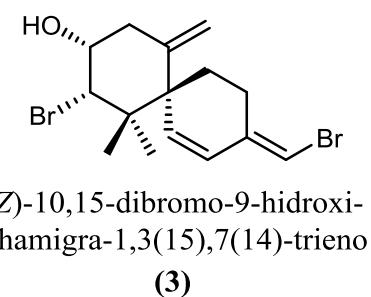
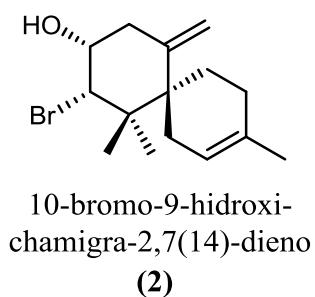
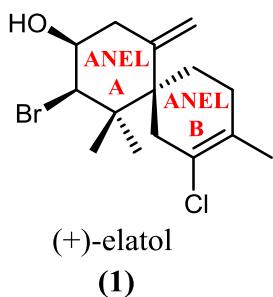
As substâncias obtidas foram analisadas por técnicas espectroscópicas de RMN (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HMBC, HSQC, APT) e EM, e por rotação óptica específica.



**Figura II.3.** Fracionamento do extrato bruto de *L. dendroidea* em diclorometano da Praia de Manguinhos (Serra – ES)

## II. 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foram obtidas e caracterizadas nove substâncias dos extratos brutos de espécimes de *L. dendroidea* coletados na Praia Azeda (Búzios – RJ) e na Praia de Maguinhos (Serra – ES). Sete substâncias foram obtidas puras (**1-6** e **9**) e duas obtidas em mistura (**7-8**). Todas foram classificadas como sesquiterpenos halogenados do tipo chamigrano já descritos na literatura: (+)-elatol (**1**), 10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno (**2**), (*Z*)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (**3**), (*E*)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (**4**), isoobtusol (**5**), obtusol (**6**), obtusano (**7**), nidificeno (**8**) e 3,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno (**9**).



Os sesquiterpenos são uma classe de terpenos com 15 carbonos formados a partir da união de três unidades de isoprênicas (C5). Os sesquiterpenos apresentam uma grande diversidade estrutural, incluindo sistemas acíclicos, mono-, bi, tri- e tetracíclicos (CORDELL,

1976), sendo os esqueletos chamigranos um sistema intermediário chave na construção dos outros sesquiterpenos mais complexos (WANG *et al.*, 2013). Os sesquiterpenos são o maior grupo de metabólitos secundários estudados e isolados de espécies do gêneros *Laurencia* e *Aplysia* (HARIZANI *et al.*, 2016).

Todos os sesquiterpenos identificados nesse trabalho são do tipo chamigrano, contendo dois anéis espiro de seis membros cada, ligados ao mesmo carbono quaternário (C-6). O anel A foi claramente igual nas substâncias **1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **6**, mas com diferenças na esterioquímica dos seus substituintes. Nas substâncias **7**, **8** e **9** o anel A apresentou diferenças em seus substituintes, assim como também em sua esterioquímica em relação às substâncias anteriores. Em relação ao anel B, em todas as substâncias isoladas foram observadas variações nas posições dos substituintes, bem como em suas esterioquímicas. Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de todas as substâncias elucidadas estão detalhados da **Tabela II.1**. A confirmação estrutural foi realizada pelas análises de RMN 2D, de espectroscopia de massas de alta e baixa resolução, quando possível, e rotação ótica específica ( $[\alpha]^{25}_\text{D}$ , **Tabela II.2**).

Quanto ao detalhamento da elucidação das substâncias isoladas, optou-se, primeiramente, por detalhar o processo de elucidação do anel A e B da substância **1**. Em seguida, a elucidação dos demais metabólitos foi realizada ressaltando as diferenças espectroscópicas em relação à substância **1**. Os resultados são apresentados e discutidos a seguir. É possível encontrar todos os espectros de RMN e massas utilizados para elucidação das substâncias no caderno de espectro no apêndice da tese.

### **SUSTÂNCIA 1: (+)-elatol**

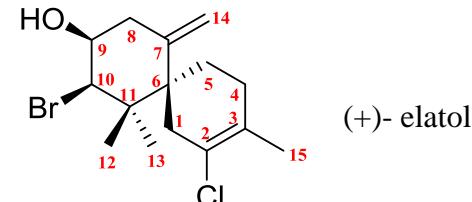
A **substância 1** foi isolada como um óleo claro,  $[\alpha]_\text{D} +79.7^\circ$  (c 0,06,  $\text{CHCl}_3$ ), com a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{OBrCl}$ , que foi proposta a partir do estudo de RMN e confirmada por espectrometria de massas, com um índice de saturação igual a quatro. Na análise do espectro de massas de alta resolução (Apêndice 2) se observou o íon molecular com separações isotópicas de massas característicos de halogenados  $m/z$  332,0505 (calc. 332,0542), 334,0537 (calc. 334,0522), com intensidade relativa 100:94 (Apêndice 1), assim como os picos relativos a perdas de fragmentos característicos de bromo, cloro e água, como 79 ( $\text{M} - \text{Br}$ ), 80 ( $\text{M} - \text{HBr}$ ), 35 ( $\text{M} - \text{Cl}$ ), 36 ( $\text{M} - \text{HCl}$ ) e 18 ( $\text{M} - \text{H}_2\text{O}$ ) no espectro de massas de baixa resolução (Apêndice 1).

A análise inicial do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da **substância 1** (Figura II.4 e Apêndice 3) indicou a presença de dois sinais que integra para 1 hidrogênio cada na região de carbono  $sp^2$ ,  $\delta_{\text{H}}$  5,11 e 4,78 (simpletos largos), dois sinais característicos da presença de heteroátomos,  $\delta_{\text{H}}$  4,60 (1H, d, 2.3 Hz) e 4,14 (1H, d, 2.3 Hz) e três sinais integrados para 3 hidrogênios cada, característicos de grupos metílicos ( $\delta_{\text{H}}$  1,69; 1,05 e 1,06). O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Figura II.5 e Apêndice 4) mostrou sinais correspondentes a quinze carbonos: três metilas a  $\delta_{\text{C}}$  19,5; 20,8 e 24,3; cinco metilenos, um deles olefínico, a  $\delta_{\text{C}}$  25,6; 29,4; 38,0; 38,6 e 11,0; dois metinos em heteroátomos  $\delta_{\text{C}}$  70,9 e 72,2; assim como cinco carbonos quaternários, um deles espiro e três do tipo  $sp^2$ , a  $\delta_{\text{C}}$  43,2; 49,2; 124,2; 128,1 e 140,8 (Tabela II.1).

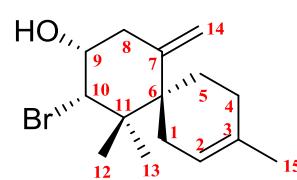
A partir destes dados se deduziu que dos quatro graus de insaturação envolvidos na fórmula molecular, dois foram correspondentes à presença das duas insaturações tipo  $sp^2$  e, consequentemente, os dois graus de insaturação restantes na estrutura puderam ser justificados pela presença de dois ciclos. Estes ciclos estão ligados através do carbono quaternário espirânico a  $\delta_{\text{C}}$  49,2. Estas características estruturais permitiram simplificar e apresentar o detalhamento, a seguir, da análise por RMN por sistemas de anel *espiro A* e *B*, separadamente.

**TABELA II.** 1. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz, 500 MHz e 300 MHz) para 9 substâncias isoladas (**1 a 9**).

nº C	(I) $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz				KÖNIG & WRIGHT, 1977*				(2) $\text{CDCl}_3$ , 600 MHz				KÖNIG & WRIGHT, 1977*			
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	m	$J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	m	$J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	m	$J$ (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	m	$J$ (Hz)
<b>1</b>	38,8 2,57	2,35 d	d	17,4 17,6	38,6	2,08 2,19	d	17,5 17,5	29,7	2,22 2,11	d	17,5 19,0	30,1	2,08 2,19	d	17,7 17,7
<b>2</b>	128,2	-			128,0	-			119,6	5,28	s		119,4	5,27	m	
<b>3</b>	124,2	-			124,1	-			132,5	-			132,5	-		
<b>4</b>	29,5 1,94	1,81 d	d	11,8 16,4	29,3	1,82 1,96	m		27,4	1,79 1,62	m		27,6	~ 1,6 ~ 1,8	m	
<b>5</b>	25,7 1,81	1,61 d	m	11,8	25,6	1,62 1,80	m		25,5	1,83 1,67	m		25,8	~ 1,6 ~ 1,8	m	
<b>6</b>	49,3	-			49,1	-			47,0	-			47,0	-		
<b>7</b>	140,9	-			140,7	-			141,1	-			141,1	-		
<b>8</b>	38,1 2,62	2,49 d	d	14,5 14,6	38,0	2,49 2,19	dd dm	2,8 – 14,4 14,4	37,8	2,70 2,48	d dd	14,1 2,4 – 14,5	37,9	2,67 2,45	dm dd	14,4 2,6 – 14,4
<b>9</b>	72,3	4,14	d	2,3	72,1	4,14	m		72,2	4,16	s		70,3	4,13	ddd	2,6 – 3,3 – 6,1
<b>10</b>	71,0	4,60	d	2,3	70,8	4,61	d	2,9	71,6	4,69	d	2,7	71,8	4,66	d	3,3
<b>11</b>	43,3	-			43,1	-			43,1	-			43,1	-		
<b>12</b>	21,0	1,05	s		20,7	1,06	s		20,3	1,04	s		20,7	1,02	s	
<b>13</b>	24,3	1,06	s		24,2	1,07	s		24,1	1,05	s		24,2	1,02	s	
<b>14</b>	116,1 5,11	4,78 s			115,8	4,79 5,12	s		115,8	4,81 5,09	s		115,8	4,78 5,06	s	
<b>15</b>	19,6	1,69	s		19,4	1,70	s		22,8	1,58	s		23,0	1,56	s	

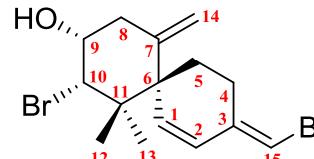
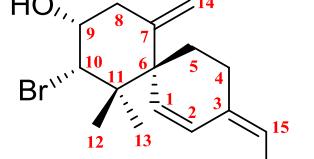


(+)- elatol

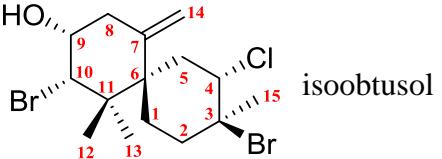
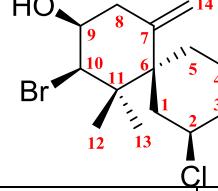


10-bromo-9-hidroxi- chamigrano-2,7(14)-dieno

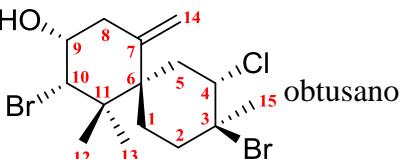
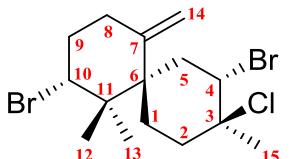
Continuação TABELA II. 1.

													
		(Z)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno				(E)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno							
		(3) CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz		SUZUKI & KUROSAWA, 1978 ( <sup>1</sup> H)* COLL & WRIGT, 1989 ( <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C)*		(4) CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz		COLL & WRIGT, 1989*					
nº C		δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H	m	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H	m	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H	m	J (Hz)
<b>1</b>		129,2	6,21	d	10,3	129,2	6,20	d	10,3	127,0	6,66	d	10,5
<b>2</b>		132,8	5,89	d	10,2	132,8	5,88	d	10,3	136,5	6,11	d br	10,5
<b>3</b>		139,5	-			139,5	-			137,2	-		
		1,99	m							2,32	m		
<b>4</b>		25,1	1,75	ddd	18,1 - 10,8 - 3,8	25,7	1,7	m		27,4	2,20	m	
<b>5</b>		24,4	2,64	m		24,5	2,3			26,3	1,95	m	
										1,78	m		
<b>6</b>		51,8	-			51,8	-			52,0	-		
<b>7</b>		143,0	-			143,0	-			143,4	-		
		2,71	dd	15,9 - 2,1		38,0	2,59	d	2,0	37,8	2,73	dd	15,1-2,2
<b>8</b>		37,8	2,58	dd	15,0 - 2,4					2,61	dd	15,1-2,3	
<b>9</b>		72,0	4,17	m		72,0	4,09	m		71,9	4,19	m	
<b>10</b>		70,2	4,65	d	2,9	70,3	4,54	d	3,0	70,2	4,63	d	2,9
<b>11</b>		42,7	-			42,7	-			42,8	-		
<b>12</b>		20,7	1,24	s		21,4	1,22	s		21,4	1,27	s	
<b>13</b>		28,8	1,01	s		26,6	0,99	s		26,5	1,03	s	
<b>14</b>		117,4	4,82	s		117,4	4,83	s		117,9	4,86	s	
		5,10	s			5,11	s			5,16	s		
<b>15</b>		105,4	6,11	s		105,5	5,87	s		101,5	5,93	s	

Continuação TABELA II. 1.

 <p>isoobtusol</p>								 <p>obtusol</p>								
nº C	(5) CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz				WESSELS, et al. 2000*				(6) CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz				GONZÁLEZ, et al. 1979b*, WESSELS, et al. 2000*			
	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H	m	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H	m	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H	m	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H	m	J (Hz)
<b>1</b>	33,9 3,09	2,80 d	dd 14,5	3,2 - 15,6	33,9	2,80	dd	3,6 - 15,8	25,8	1,75	m		25,6	SA		
<b>2</b>	65,2	4,44	s		65,2	4,45	m		40,7	2,29	m		40,5	SA		
<b>3</b>	71,1	-			71,2	-			67,7	-			67,6	-		
<b>4</b>	33,2 2,24	1,84 t	dd 14,3	14,8 - 2,0	33,4	1,87 2,25	m m		68,3	4,71	dd	1,8 - 10,4	68,1	4,70	dd	4,4 - 11,2
<b>5</b>	25,6 2,04	1,78 dt	dd 13,8 - 3,3	14,2 - 2,7	25,4	1,82 2,03	m m		37,3	1,89 1,96	d d	3,9 12,9	37,1	SA		
<b>6</b>	44,0	-			43,8	-			50,3	-			50,3	-		
<b>7</b>	148,1	-			147,2	-			141,2	-			141,2	-		
<b>8</b>	39,4 2,7	2,43 t	d 12,1	10,6	39,1	2,42 2,69	dd dd	5,4 - 12,6 4,1 - 12,6	38,7	2,62 4,50	dd dd	3,6 - 13,7 2,4 - 14,2	38,5	2,62 2,49	dd dd	3,1 - 14,2 2,4 - 14,2
<b>9</b>	69,8	3,66	d	3,1	69,7	3,66	m		71,8	4,12	m		71,9	4,11	m	
<b>10</b>	76,2	4,41	d	12,4	76,2	4,42	dd	1,9 - 3,8	72,1	4,47	d	2,8	70,1	4,47	d	3,0
<b>11</b>	43,7	-			43,5	-			44,4	-			44,2	-		
<b>12</b>	25,6	1,05	s		25,2	1,06	s		24,3	1,08	s		24,2	1,08	s	
<b>13</b>	24,9	1,34	s		24,7	1,34	s		20,3	1,08	s		20,6	1,08	s	
<b>14</b>	113,8 5,17	4,92 s			113,7	4,93 5,17	s s		118,0	5,05 5,39	s s		117,8 5,39	5,05 s	s	
<b>15</b>	32,8	1,92	s		33,0	1,92	s		24,1	1,83	s		23,9	1,83	s	

Continuação TABELA II. 1.

 obtusano										 nidificeno									
(7) CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz					FURASAKI, et al. 1983*, GONZÁLEZ, et al. 1979b*					(8) CDCl <sub>3</sub> , 500 MHz					McPHAIL et al. 1999*				
nº C	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H	m	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H	m	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H	m	J (Hz)	δ <sup>13</sup> C	δ <sup>1</sup> H	m	J (Hz)			
1	25,6 1,73	1,86 m	m		25,5	1,6 – 2,4	m		25,5	2,93 1,73	m		25,4	1,97 1,72	m				
2	68,0	4,72	m		67,9	4,72	dd	5,0 -13,0	38,8	2,45 2,15	m		38,7	2,44 2,14	m				
3	68,5	-			68,2	-			72,0	-			71,8	-					
4	40,5 2,11	2,28 m	m		40,5	1,6 – 2,4	m		61,5	4,72	m		61,4	4,71	dd	5-0 – 13,0			
5	37,4 1,98	2,28 m	m		37,2	1,6 – 2,4	m		38,8	2,11 1,94	m		38,6	2,14 1,94	m				
6	50,5	-			50,4	-			51,2	-			51,1	-					
7	145,8	-			145,8	-			145,7	-			145,6	-					
8	33,6 2,15	2,33 m	m		33,5	1,6 – 2,4	m		33,6	2,33 2,15	m		33,8	2,31 2,14	m				
9	35,9 2,25	2,03 m	m		35,9	1,6 – 2,4	m		35,9	1,98 2,25	m		35,8	2,25 2,02	m				
10	63,7	4,44	dd	4,6 - 12,9	63,4	4,45	dd	4,0 – 13,0	63,7	4,44	dd	4,6 - 12,9	63,6	4,43	dd	5-0 – 13,0			
11	43,9	-			53,9	-			44,0	-			43,8	-					
12	23,7	1,14	s		23,6	1,14	s		17,6	0,96	s		17,5	0,95	s				
13	17,6	0,96	s		17,5	0,96	s		23,7	1,15	s		23,6	1,14	s				
14	114,7 5,26	4,87 s			114,7	4,87 5,26	s		114,7	4,87 5,26	s		114,7	4,86 5,25	s				
15	25,6	1,83	s		25,7	1,83	s		24,1	1,70	s		24,1	1,69	s				

Continuação TABELA II. 1.

<p>3,10-dibromo-4-cloro-<math>\alpha</math>-chamigreno</p>								
	(9) CDCl <sub>3</sub> , 600 MHz				DIAS, <i>et al.</i> 2005*			
nº C	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	m	J (Hz)	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$	m	J (Hz)
<b>1</b>	31,8	1,50	m		31,7	1,55	m	
		2,01	m			2,00	m	
<b>2</b>	42,4	2,41	ddd	3,4- 4,4 -14,1	42,3	2,41	ddd	4,4 - 4,4 - 14,1
		2,55	m			2,55	m	
<b>3</b>	68,0	-			67,8	-		
<b>4</b>	69,6	4,89	dd	11,9 - 6,2	69,5	4,88	dd	6,4 - 11,8
<b>5</b>	38,1	2,10	m		38,0	2,08	m	
<b>6</b>	47,4	-			47,3	-		
<b>7</b>	139,8	-			139,7	-		
<b>8</b>	123,1	5,24	m		123,0	5,24	m	
<b>9</b>	36,4	2,67	m		36,3	2,69	m	
		2,55	m			2,55	m	
<b>10</b>	61,1	4,52	dd	10,8 - 6,8	60,9	4,52	dd	6,8 - 10,8
<b>11</b>	43,1	-			43,0	-		
<b>12</b>	24,7	1,21	s		24,6	1,20	s	
<b>13</b>	17,3	0,94	s		17,1	0,94	s	
<b>14</b>	26,2	1,25	s		26,0	1,94	s	
<b>15</b>	24,1	1,84	s		24,0	1,84		

(\*)

COLL & WRIGT, 1989.....(CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz)  
 DIAS, *et al.*, 2005.....(CDCl<sub>3</sub>, 500 MHz)  
 FURUSAKI, *et al.*, 1983.....(CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)  
 GONZÁLEZ, *et al.*, 1979b.....(CDCl<sub>3</sub>, 50 MHz)  
 KÖNIG & WRIGHT, 1977.....(CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz- <sup>13</sup>C e 300 MHz- <sup>1</sup>H)  
 MCPHAIL *et al.*, 1999.....(CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  
 SUZUKI & KUROSAWA *et al.*, 1978... (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz)  
 WESSELS, *et al.*, 2000.....(CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz- <sup>13</sup>C e 300 MHz- <sup>1</sup>H)

$\delta$  = deslocamento químico em ppm;

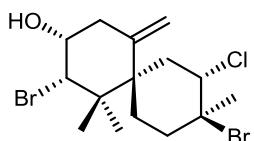
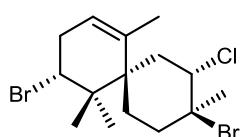
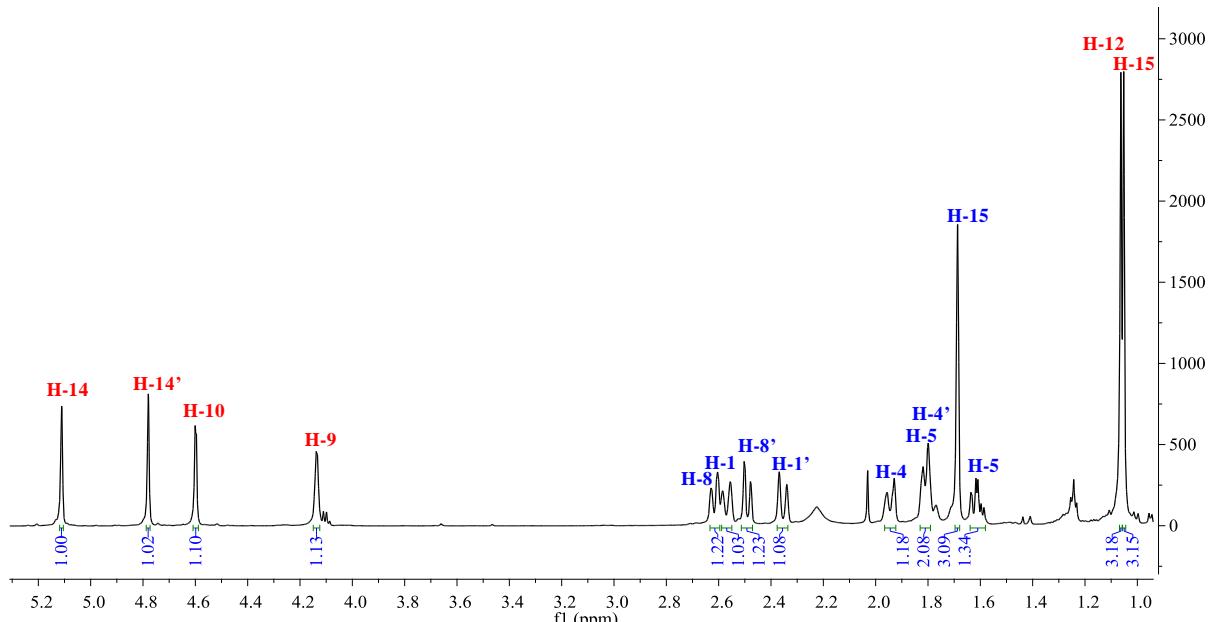
m = multiplicidade;

J = constante de acoplamento em Hertz

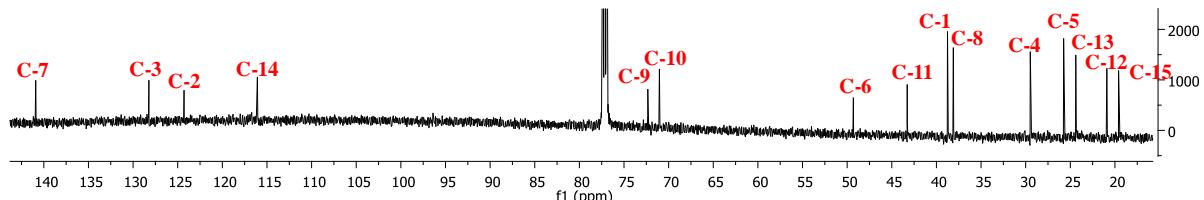
SA = Sem Assinalamento

**TABELA II.2.** Dados de rotação óptica ( $[\alpha]_D$ ) das substâncias isoladas comparados com a literatura.

Substância	Dados de $[\alpha]_D$ obtidos experimentalmente	Dados de $[\alpha]_D$ da literatura
	$[\alpha]_D +79^\circ$ (c 0,06, CHCl <sub>3</sub> )	$[\alpha]_D +75^\circ$ (c 1,01, CHCl <sub>3</sub> ) BRENNAN, et al., 1987
(+)-elatol (1)		
	$[\alpha]_D -125^\circ$ (c 0,008, CHCl <sub>3</sub> )	$[\alpha]_D -110^\circ$ (c 0,20, CHCl <sub>3</sub> ) VAIRAPPAN et al., 2001
10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno (2)		
	$[\alpha]_D +10^\circ$ (c 0,02, CHCl <sub>3</sub> )	$[\alpha]_D +3$ (c 0,002, CHCl <sub>3</sub> ) COLL & WRIGHT, 1989
(Z)-10,15-dibromo-9-hydroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno (3)		
	$[\alpha]_D -31^\circ$ (c 0,016, CHCl <sub>3</sub> )	$[\alpha]_D -40$ (c 0,002, CHCl <sub>3</sub> ) COLL & WRIGHT, 1989
(E)-10,15-dibromo-9-hydroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno (4)		
	$[\alpha]_D +77$ (c 0,03, CHCl <sub>3</sub> )	$[\alpha]_D +24,8^\circ$ (c 0,48, CHCl <sub>3</sub> ) VAIRAPPAN et al., 2001
isoobtusol (5)		

obtusol (**6**) $[\alpha]_D + 9,61$  (c 0,05, CHCl<sub>3</sub>) $[\alpha]_D + 33^\circ$ GONZALEZ, *et al.*, 19793,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno (**9**) $[\alpha]_D - 36,19$  (c 0,05, MeOH) $[\alpha]_D - 210,2^\circ$  (c 0,033, CHCl<sub>3</sub>)DIAS *et al.*, 2005

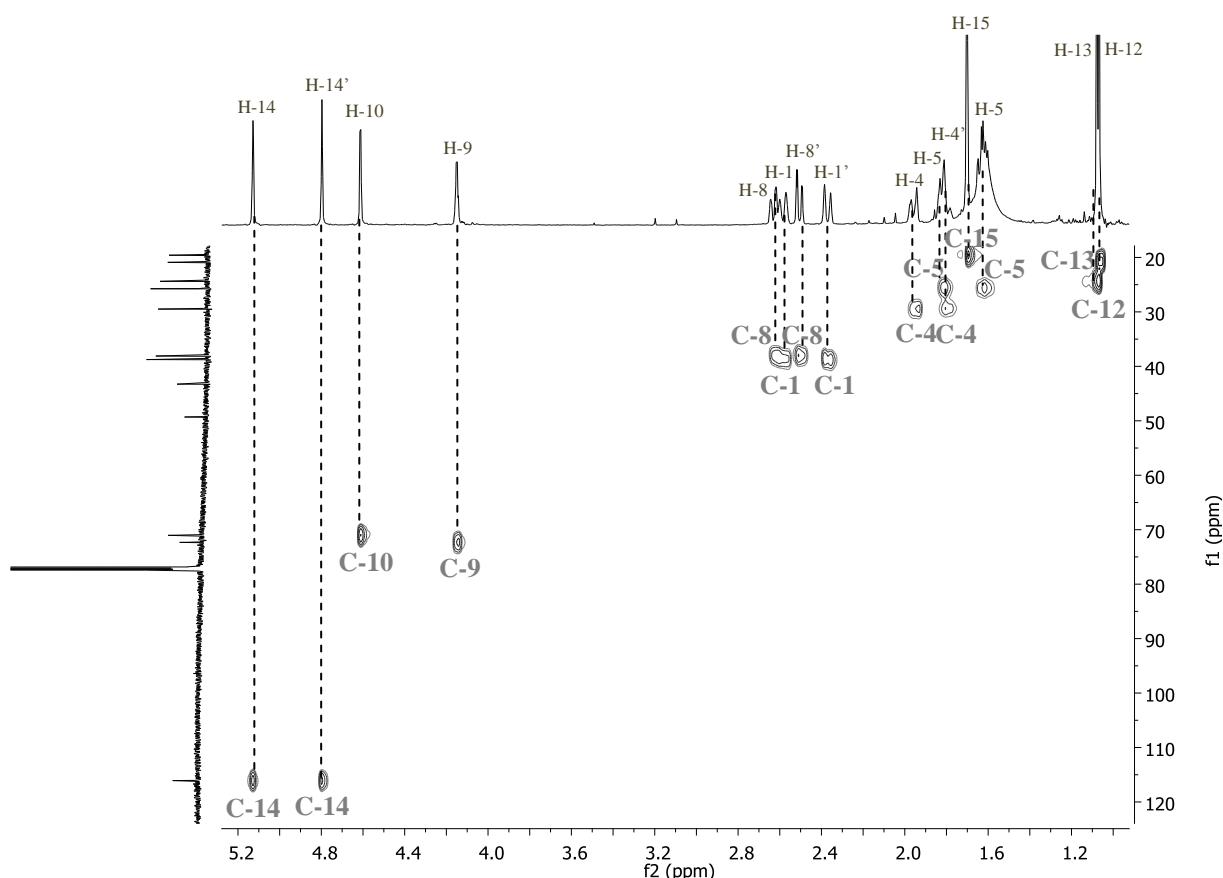
**Figura II.4.** Espectro de  $^1\text{H}$  (CDCl<sub>3</sub>, 600MHz) da substância **1** identificada como (+)-elatol. Em vermelho estão destacados os hidrogênios do anel A e em azul os hidrogênios do anel B.



**Figura II.5.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (CDCl<sub>3</sub>, 600MHz) da substância **1** identificada como (+)-elatol.

### Determinação do anel A

A elucidação da estrutura do anel A iniciou-se pelo espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura II.5 e Apêndice 3) com a análise dos simpletos localizados na região de  $\delta_{\text{H}}$  1.07 ( $\text{H}_{3-12}$ ) e 1.08 ( $\text{H}_{3-13}$ ), que juntos integram para 6 hidrogênios. Estes sinais correspondem à presença de duas metilas (3H cada, Figura II.4) que, dada suas multiplicidades, estão ligadas a um carbono quaternário. O deslocamento químico do carbono de cada metila foi determinado por HSQC (Figura II.6 e Apêndice 6), espectro bidimensional que reflete os acoplamentos dos sinais de hidrogênio com seus carbonos correspondentes, sendo o valor dos mesmos  $\delta_{\text{C}}$  20,8 (C-12) e 24,3 (C-13).



**Figura II.6.** Espectro de RMN de HSQC ( $\text{CDCl}_3$ , 600MHz) da substância **1** identificada como (+)-elatol, destacando os assinalamentos de carbono e seus respectivos hidrogênios.

Pelo espectro de HMBC (acoplamento  $^1\text{H}-^{13}\text{C}$  a duas e três ligações) (Apêndice 7) pode-se definir que as metilas (C-13 e C-14) eram geminais, pois apresentaram conectividade entre si, e estavam ligadas no mesmo átomo de carbono quaternário a  $\delta_{\text{C}}$  43,2 (C-11). Carbono que, por sua vez, estava vizinho a um outro carbono quaternário espiro a  $\delta_{\text{C}}$  49,2 (C-6) e um carbono metil unido ao heteroátomo localizado a  $\delta_{\text{C}}$  70,9 (C-10) (Figura II.7).

Prosseguindo com elucidação estrutural do anel A, a partir da análise de HSQC (Figura II.6 e Apêndice 6) pôde-se determinar que o C-10 estava ligado ao hidrogênio a  $\delta_H$  4,61 (H-10). A análise de COSY (Apêndice 5) revelou a correlação do H-10 com o hidrogênio metílico também correspondente a região de heteroátomo a  $\delta_H$  4,15 (H-9) e este, por sua vez, com os hidrogênios a  $\delta_H$  2,51/2,63 de um grupo metíleno (H<sub>2</sub>-8); estabelecendo assim o fragmento: CHX-  $\delta_H$  4,62 (H-10)  $\leftrightarrow$  CHX-  $\delta_H$  4,15 (H-9)  $\leftrightarrow$  CH<sub>2</sub>-  $\delta_H$  2,51/2,63 (H-8'/H-8) (Figura II.7). Através do espectro de HSQC se determinou o carbono C-10 a  $\delta_C$  70,9, C-9 a  $\delta_C$  72,2 e C-8 a  $\delta_C$  38,0.

Por fim, para conclusão sobre o anel A, pelo HMBC (Apêndice 7) pôde-se observar o acoplamento dos hidrogênios do metilênicos H<sub>2</sub>-8 com um carbono quaternário olefínico a  $\delta_C$  140,8 (C-7); com um carbono sp<sup>2</sup> exocíclico a  $\delta_C$  116,0 (C-14) e com o carbono totalmente substituído anteriormente determinado como C-6 (Figura II.7). Os deslocamentos do hidrogênio do metíleno exocíclico C-14 a  $\delta_H$  4,80 e  $\delta_C$  5,13 foram propostos através da análise de HSQC. Desta forma, foi possível elucidar um anel de ciclohexano cujas principais características são a presença de uma ligação dupla exocíclica na posição C-7, a existência de dois heteroátomos em C-9 e C-10 e um *gem*-dimetilo em C-11.

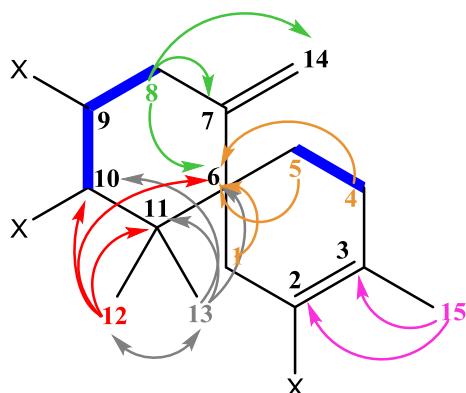
### *Determinação do anel B*

Restando definir mais seis carbonos (um deles metílico), um halogênio, uma insaturação e um ciclo para finalizar a estrutura **1**, iniciou-se a determinação do anel B pela análise de HMBC (Apêndice 7), a partir do carbono espiro que une os sistemas de anel, o carbono C-6. Deste modo, o C-6 se encontra em acoplamentos a hidrogênios diastereotópicos de dois metilenos, a  $\delta_H$  com os 2,37/2,59 do C-1 e 1,83/1,63 do C-4 e ao  $\delta_H$  1,83/1,96 do C-5 (Figura II.7). A análise de COSY para os hidrogênios anteriores revela que o primeiro metíleno aparece como um sistema isolado (H-1'/H-1), enquanto o H<sub>2</sub>-4 se acopla a um novo grupo metíleno  $\delta_H$  1,83/1,96 (H-5'/H-5) constituindo assim outro fragmento (Figura III.7): CH<sub>2</sub>.  $\delta_H$  1,63/1,82 (H-5'/H-5)  $\leftrightarrow$  CH<sub>2</sub>.  $\delta_H$  1,83/1,96 (H-4'/H-4). A atribuição de cada um de seus carbonos se completou por meio das correlações de HSQC correspondentes a  $\delta_C$  38,6 (C-1), 25,6 (C-5) e 29,4 (C-4).

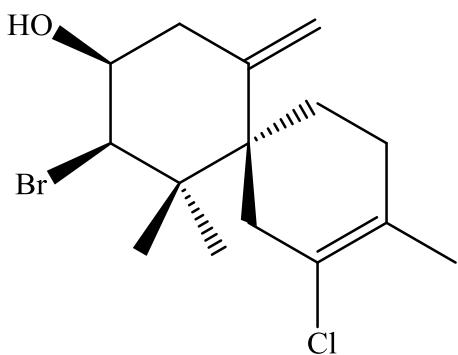
No espectro de HMBC, o H-1'/H-1, assim como o H-4'/H-4, se conectam a dois novos carbonos quaternários localizados na região do espectro <sup>13</sup>C característica de ligação dupla, C-

2 ( $\delta_C$  124,1) e C-3 ( $\delta_C$  128,1), que se acoplam entre si em uma ligação tipo  $sp^2$  fechando o anel B. A elucidação estrutural da **substância 1** concluiu-se com a determinação do último grupo metílico a  $\delta_C$  19,5 assinalado como C-15, onde pelos acoplamentos de HMBC (Apêndice 7) observou-se uma correlação entre seu sinal de  $^1H$  simpleto a 1,70 ppm com os carbonos C-2, C-3 e C-4 (Figura III.8).

A identificação e a localização dos heteroátomos nas posições C-2, C-9 e C-10 se realizou de acordo com os dados de massas e os valores de deslocamento químico de RMN. Foi possível assinalar a presença de um átomo bromo em C-10, um grupamento hidroxila em C-9 e um átomo cloro em C-2. A estrutura plana coincide com a do metabólito conhecido como elatol (KÖNIG & WRIGHT, 1997), e o sinal da rotação óptica obtida ( $[\alpha]_D +79^\circ$ , c 0.06,  $CHCl_3$ ), comparada com a da literatura ( $[\alpha]_D +75^\circ$ , c 1.01,  $CHCl_3$  (*in* BRENNAN *et al.*, 1987) confirmou que se trata do (+)-**elatol** (Figura II.8). O elatol também já foi descrito para a espécie *L. dendroidea* na costa brasileira (SANTOS *et al.*, 2010; BORN *et al.*, 2012). Inclusive, seu isômero, o (-)-elatol, isolado pela primeira vez também de *L. dendroidea* (MACHADO *et al.*, 2011), foi descrito para esta mesma população (Praia Azeda, Búzios, RJ) (MACHADO *et al.*, 2016).



**Figura II.7.** Estrutura destacando as principais correlações observadas para a substância 1 identificada como (+)-elatol. As linhas destacadas em azul representam as correlações no espectro de RMN de COSY. As setas indicam as correlações no espectro de HMBC, destacando em verde as do C-8; em vermelho as do C-12; em cinza as do C-13; em laranja as do C-1, C-4 e C-6 com o C-6 e em rosa as do C-15



**Figura II.8.** Estrutura da substância 1, identificada como (+)-elatol

O elatol foi isolado pela primeira vez da espécie *L. elata* (SIMS *et al.*, 1974). Desde então vem sendo isolado de várias outras espécies de *Laurencia*, entre elas: *L. cartilaginea* (JUAGDAN *et al.*, 1997), *L. chondrioides* (BANSEMIR *et al.*, 2004), *L. decumbens* (JI *et al.*, 2007a), *L. majuscula* (CAPON *et al.*, 1988; COLL & WRIGHT, 1989; VAIRAPPAN *et al.*, 2001a, 2010; PALANIVELOO & VAIRAPPAN, 2014), *L. mariannensis* (JI *et al.*, 2007c), *L. microcladia* (LHULLIER *et al.*, 2009a), *L. obtusa* (GONZÁLEZ *et al.*, 1976; BRENNAN *et al.*, 1987; GERWICK *et al.*, 1987; KENNEDY *et al.*, 1988; PEREIRA *et al.*, 2003), *L. pacifica* (FENICAL & NORRIS, 1975), *L. rigida* (KÖNIG & WRIGHT, 1997), *L. scoparia* (KENNEDY *et al.*, 1988), *L. similis* (JI *et al.*, 2007b). Este metabólito também foi isolado de espécies de molusco do gênero *Aplysia* como: *A. dactylomela* (WESSELS *et al.*, 2000; DIAS *et al.*, 2005; DÍAZ-MARRERO *et al.*, 2012; PALANIVELOO & VAIRAPPAN, 2014) e *A. parvula* (VAIRAPPAN *et al.*, 2009)

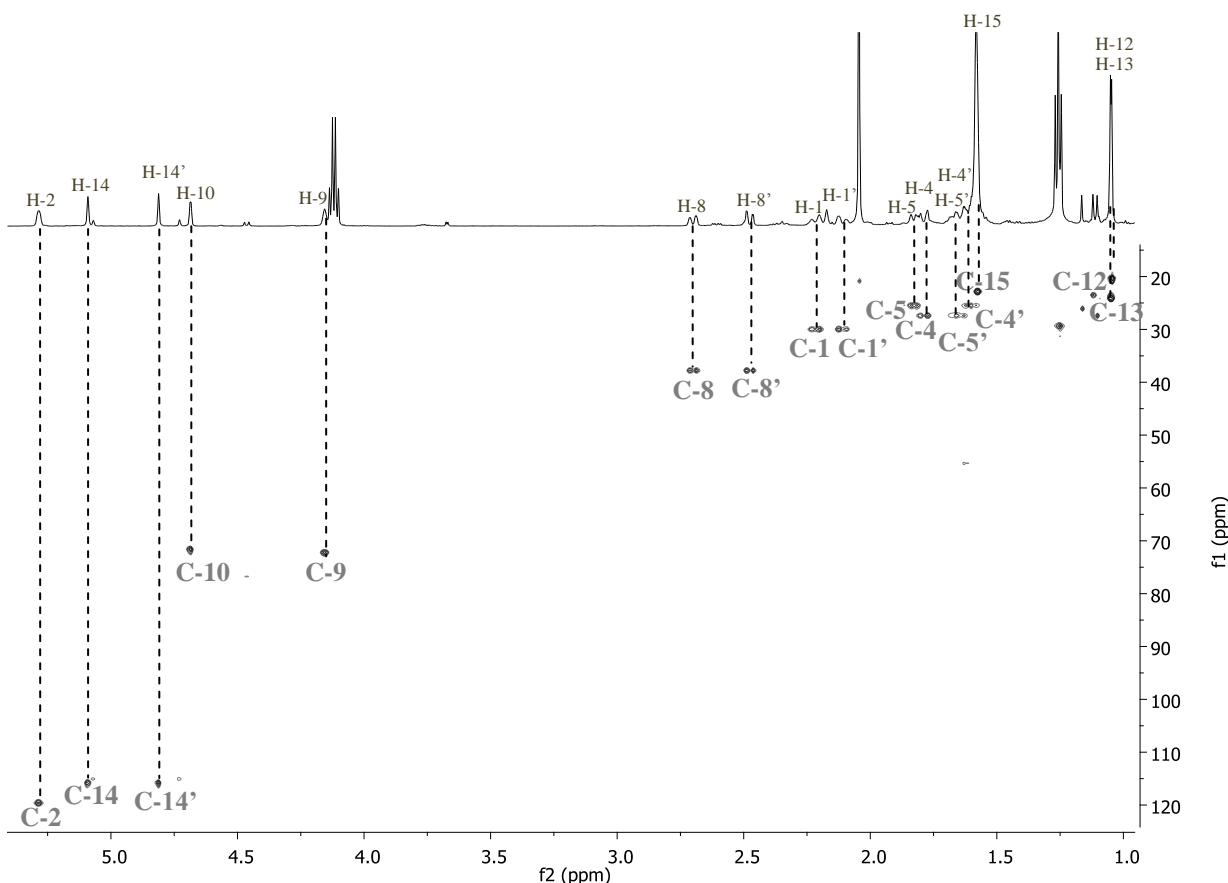
O elatol é um dos metabólitos de *Laurencia* mais estudado, tanto na área de fármacos quanto na área de ecologia química. Esta substância vem se destacando como promissor alvo nos estudos biomédicos, apresentando relevantes atividades antileishmania (SANTOS *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2011; MACHADO *et al.*, 2014), antibacteriana (KÖNIG & WRIGHT, 1997; VAIRAPPAN *et al.*, 2001a; BANSEMIR *et al.*, 2004; VAIRAPPAN *et al.*, 2010; BIANCO *et al.*, 2015), antifúngica (KÖNIG & WRIGHT, 1997), potencial larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti*, vetor dos vírus da dengue, zika e chicungunha (SALVADOR-NETO *et al.*, 2016), propriedades acaricidas e repelentes contra o ácaro *Tetranychus urticae* (BORN *et al.*, 2012), ação trypanocida (VEIGA-SANTOS *et al.*, 2010; DESOTI *et al.*, 2012, 2014) e atividade citotóxica em linhagem de células de câncer (JUAGDAN *et al.*, 1997; WESSELS, *et al.*, 2000; DIAS *et al.*, 2005; VAIRAPPAN *et al.*, 2009; CAMPOS *et al.*, 2012). Estes fatos despertaram o interesse de químicos para a realização de síntese deste metabólito em laboratório (WHITE *et al.*, 2008).

Na área de ecologia química, vários estudos têm demonstrado que o elatol desempenha papéis importantes nas interações ecológicas envolvendo espécies de *Laurencia* no ambiente marinho, inibindo o consumo por diversos herbívoros como caranguejo *Pachygrapsus transversuse* o ouriço *Lytechinus variegatus* (PEREIRA *et al.*, 2003) e peixes recifais (HAY *et al.*, 1987). Além disso, estudos relataram a atividade anti-incrustante deste metabólito, inibindo o assentamento de larvas de craca *Balanus amphitrite* e briozoários *Bugula neritina* (DE NYS *et al.*, 1996; KÖNIG & WRIGHT, 1997), de indivíduos de mexilhão *Perna perna* (DA GAMA *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2003), algas e bactérias epífitas (DE NYS *et al.*, 1996); mas esse metabólito não foi capaz de inibir o consumo do ouriço *Echinometra lucunter* (LHULLIER *et al.*, 2009a). Sua concentração na superfície de *L. obtusa* também não foi suficiente para a inibição de herbívoros ouriço-do-mar *Lytechinus variegatus* e a fixação do mexilhão *Perna perna*, enquanto que a concentração natural dentro do talo foi suficiente para inibição destes processos (SUDATTI *et al.*, 2006).

### **SUBSTÂNCIA 2 : 10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno**

A **substância 2** foi isolada como um óleo incolor  $[\alpha]_D -125^\circ$  (*c* 0,008,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). O espectro de massas de alta resolução mostrou um pico a *m/z*: 298.0936 (calc. 298.0932) e 300,0909 (calc 300,0912) com intensidade relativa 100:97, com fórmula molecular correspondente a  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{BrO}$ , com quatro graus de insaturação.

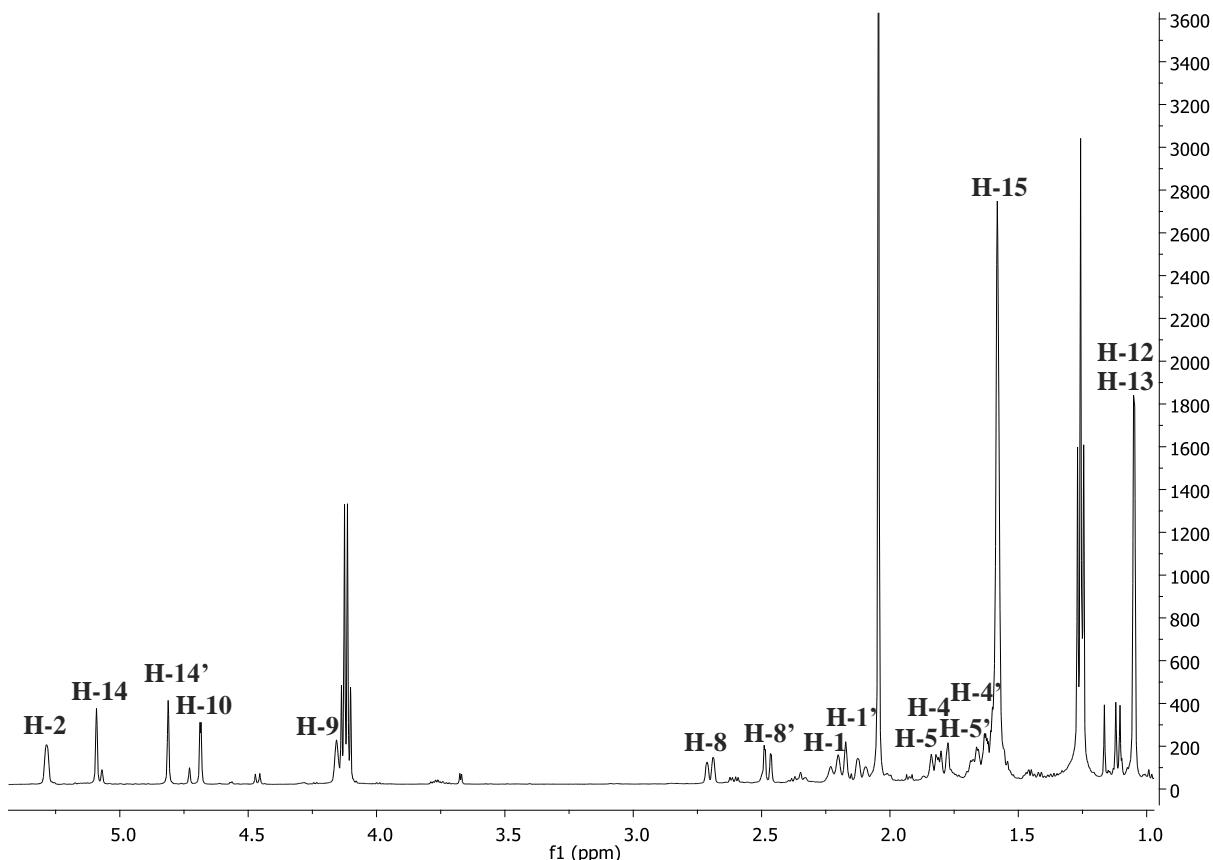
A análise dos espectros de HSQC (Figura II.9 e Apêndice 12) revelou sinais correspondentes a onze carbonos de diferentes naturezas: três carbonos metínicos, um deles olefínico ( $\delta_C$  72,2; 71,6; 119,6 ppm); cinco carbonos metilênicos ( $\delta_C$  29,36; 27,4; 25,5; 37,8 e 115,8 ppm) e três carbonos metílicos ( $\delta_C$  20,3; 24,1 e 22,9 ppm). A partir destes dados se deduz que dos quatro graus de insaturação envolvidos na fórmula molecular, dois são devidos aos átomos de carbono tipo  $sp^2$ , e assim como na **substância 1**, os dois graus de insaturação se justificam pela existência de dois ciclos na estrutura ligados por carbono quaternário espirânicos a C-6.



**Figura II.9.** Espectro de RMN de HSQC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da **substância 2** identificada como 10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno, destacando os assinalamentos de carbono e seus respectivos hidrogênios.

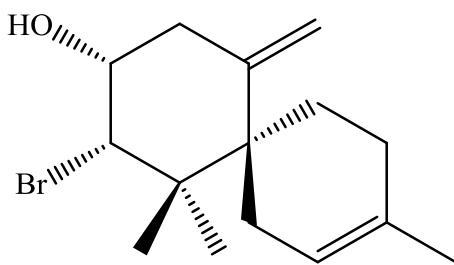
A interpretação dos dados dos experimentos de COSY (Apêndice 11) e HSQC (Anexo 12) permitiu atribuir os sinais de carbono e de RMN  $^1\text{H}$  (Figura II.10 e Apêndice 10) para **substância 2**, como se observa na **Tabela II.1**. Os dados dos carbonos quaternários foram mensurados a partir da literatura (VAIRAPPAN *et al.*, 2001).

A partir dos dados espectroscópicos pôde-se afirmar que a **substância 2** possui o mesmo esqueleto carbônico da **substância 1**. Com o mesmo anel A formado por um ciclohexano cujas principais características são a presença de uma ligação dupla exocíclica no carbono quaternário C-7, a presença de dois heteroátomos nos carbonos metínicos C-9 e C-10 e um *gem*-dimetilo em carbono totalmente substituído em C-11. A **substância II.2** se diferenciou unicamente na posição H-1'/H-1 do anel B, que nesta substância se conectou com um carbono metílico  $\delta_{\text{C}}$  119,6 (C-2).



**Figura II.10.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **2** identificada como 10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno.

Em seu espectro de massas (Apêndice 8) observou-se os íons  $m/z$  283 e 300, com intensidades relativas compatíveis à presença de um átomo de bromo na estrutura. De acordo com os deslocamentos químicos no RMN  $^1\text{H}$  (Figura II.10 e Apêndice 10) e os dados de HSQC (Figura II.9 e Apêndice 12), foi possível atribuir a posição do átomo de bromo no carbono em  $\delta_{\text{C}}$  71,61 /  $\delta_{\text{H}}$  4,69. A comparação dos dados espectroscópicos de RMN e espectroscopia de massas com os descritos na literatura, possibilitou identificar a **substância 2** como sendo o sesquiterpeno descloroelatol, isolado de *L. obtusa* (KENNEDY et al., 1988) e *L. rigida* (KÖNIG & WRIGHT, 1997). Entretanto, o dado de rotação óptica (obtido:  $[\alpha]_D$  -125°, c 0.008,  $\text{CHCl}_3$ . Literatura  $[\alpha]_D$  -110°, c 0.20,  $\text{CHCl}_3$  in VAIRAPPAN et al. 2001) permitiu caracterizar a **substância 2** como sendo o **10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno** (Figura II.11), um dos diastereoisômeros do descloroelatol, descrito anteriormente (WRIGHT & COLL, 1990; VAIRAPPAN et al., 2001), ambos isolados de *L. majuscula*.



**Figura II.11:** Estrutura da substância 2, identificado como 10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno

A única atividade descrita até o momento para o metabólito 10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno (**2**) foi a sua ação contra as bactérias marinhas gran-negativas *Alcaligenes aquamarinus*, *Azomonas agilis*, *Azobacter beijerinckii*, *Erwinia amylovora* e *Escherichia coli* (VAIRAPPAN *et al.*, 2001b).

**SUBSTÂNCIA 3:** (Z)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno e

**SUBSTÂNCIA 4:** (E)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno

As **substâncias 3** e **4** foram obtidas puras, mas por se tratarem de estereoisômeros, convenientemente preferiu-se descrever a elucidação das duas substâncias juntas, ressaltando as diferenças estruturais que permitiram a identificação de cada uma delas.

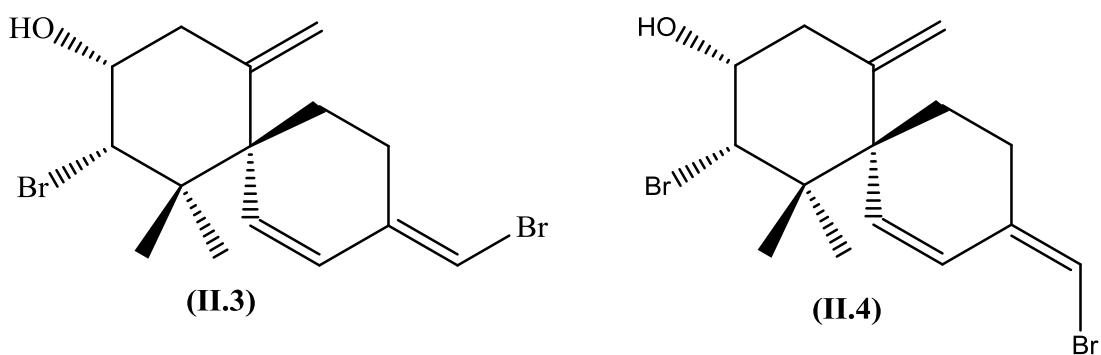
Ambas as **substâncias 3** e **4** foram isoladas como óleo incolor,  $[\alpha]_D +10$  (c 0,02,  $\text{CHCl}_3$ ) ;  $[\alpha]_D -31$  (c 0,016,  $\text{CHCl}_3$ ), respectivamente. Os dados de espectroscopia de massas de alta resolução (Apêndices 14 e 19) permitiram observar que as substâncias tinham a mesma fórmula e massa molecular ( $C_{15}\text{H}_{20}\text{OBr}_2$ ,  $m/z$  398,9860). A partir da fórmula molecular foi possível propor que ambas as substâncias apresentam cinco graus de insaturação em suas estruturas.

A análise dos dados de HSQC (Apêndices 14 e 18) dos dois metabólitos revelou sinais correspondentes a onze carbonos: cinco metínicos, sendo dois olefínicos e dois ligados a heteroátomos (C-1, C-2, C-9, C-10); quatro metilênicos, um deles olefínico (C-4, C-5, C-8, C-14 e C-15) e dois metílicos (C-12 e C-13). Os assinalamentos dos carbonos de ambas as substâncias estão descritos na Tabela II.1 e foram obtidos pelos dados de HSQC e HMBC. A

partir destes dados se deduz que dos cinco graus de insaturação envolvidos na fórmula molecular, três são devidos aos átomos de carbono olefínicos, e os dois graus de insaturação restantes se justificam pela existência de dois ciclos na estrutura, ligados por um carbono quaternário espirântico C-6.

A interpretação dos dados dos experimentos de COSY (Apêndices 16 e 21) e HSQC (Apêndices 17 e 22) permitiu atribuir os sinais de RMN  $^1\text{H}$  (Figuras II.17 e II.18; Apêndices 15 e 20) e carbono  $^{13}\text{C}$  para a **substâncias 3 e 4**, como pode ser observado na Tabela II.1. Os dados dos carbonos quaternários das duas substâncias foram mensurados pela literatura (COLL & WRIGHT, 1989).

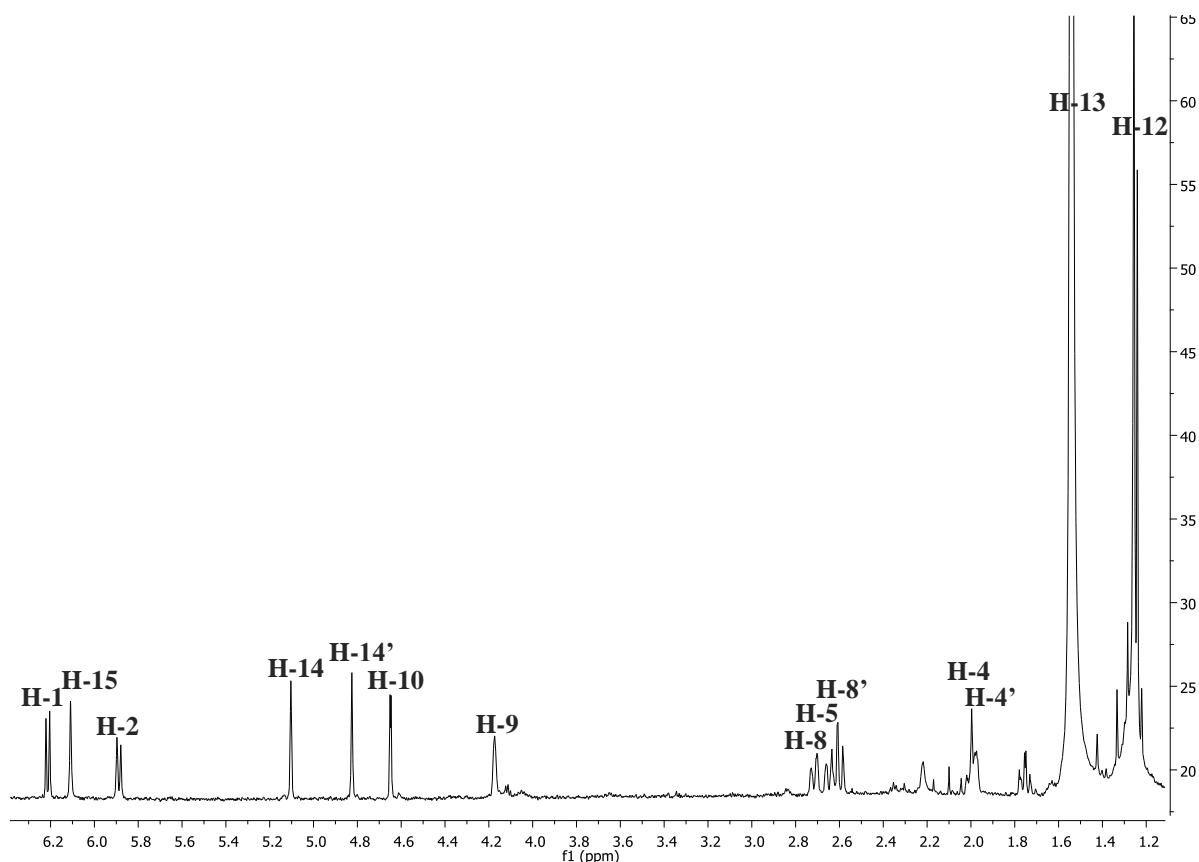
Comparando os dados espectroscópicos das substâncias **3** e **4**, pôde-se afirmar que se tratavam de diastereoisômeros com o mesmo esqueleto estrutural da substância **1**, diferenciando-se unicamente nas substituições do anel B. As diferenças encontradas nas propriedades espectroscópicas de RMN coincidiram com as descritas por COLL & WRIGHT (1989). E juntamente com os dados de rotação óptica específica de cada substância (**3**:  $[\alpha]_D +10^\circ$ , c 0.02,  $\text{CHCl}_3$ ; **4**:  $[\alpha]_D -31^\circ$ , c 0.016,  $\text{CHCl}_3$ . Literatura:  $[\alpha]_D +3$ ; c 0,002;  $\text{CHCl}_3$  e  $[\alpha]_D -40$ ; c 0,002;  $\text{CHCl}_3$ , respectivamente *in* COLL & WRIGHT, 1989) foi possível caracterizar a substância **3** como **(Z)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno** e a substância **4** como **(E)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-triено** (Figura II.12).



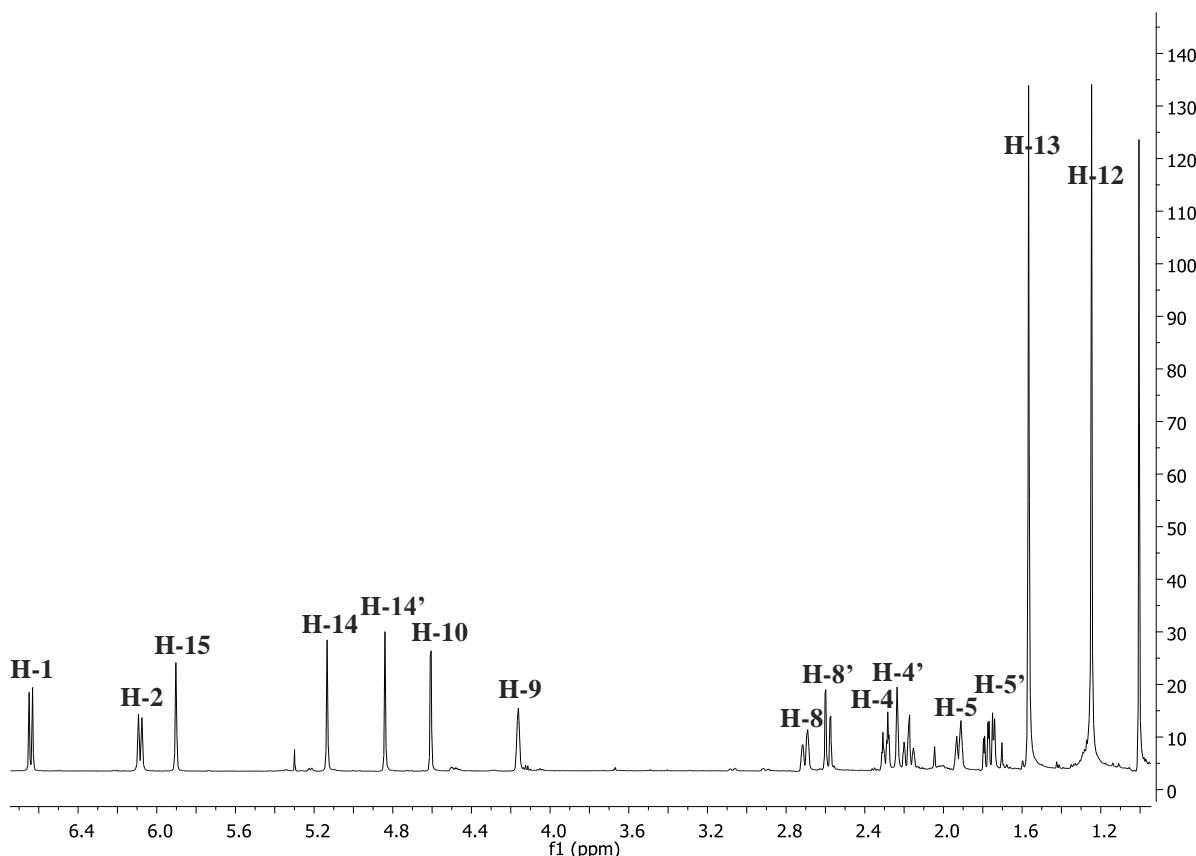
**Figura II.12.** Substância **3**, identificada como **(Z)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno**. E substância **4**, identificada como **(E)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno**

Estes diastereoisômeros apresentam diferenças sutis em relação às propriedades espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  nas posições 1, 2, 4 e 15 do anel B (Figuras II.13 e II.14) e nos

deslocamento de  $^{13}\text{C}$ . Na posição 2, o carbono vinílico e os hidrogênios apresentaram deslocamentos a  $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  132,8/5,89 em **3** e  $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  136,5/6,11 em **4**, enquanto o carbono vicinal ao sistema conjugado dieno gerou sinais em  $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  129,22/6,21 em **3** e  $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  127,0/6,66 em **4**. Já na posição 4, o carbono metínico apresentou deslocamento a  $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  25,6/ 1,99 e 1,75 em **3** e  $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  27,5/2,32 e 2,2 em **4**. Estas diferenças podem ser explicadas pela presença dos isômeros **Z** (**3**) e **E** (**4**) da função halogenada do grupamento vinilo exocíclico (C-15). A maior mudança nos valores dos deslocamentos químicos encontra-se na posição 2, ocasionada pela maior desblingagem do hidrogênio ligado ao carbono vinílico na substância **3** e a maior desblingagem na posição 4 na substância **4**, atribuída pela aproximação do carbono ligado a um átomo de bromo em C-15 ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  105,4/6,1 (s) em **3** e 101,5/5,92 (s) em **4**). O hidrogênio H-2 também apresentou diferenças pelo afastamento ( $\delta_{\text{H}}$  5,89 em **3**) ou aproximação ( $\delta_{\text{H}}$  6,11 em **4**) do grupamento ligado ao C-3 nestas duas substâncias (Figura II.15).



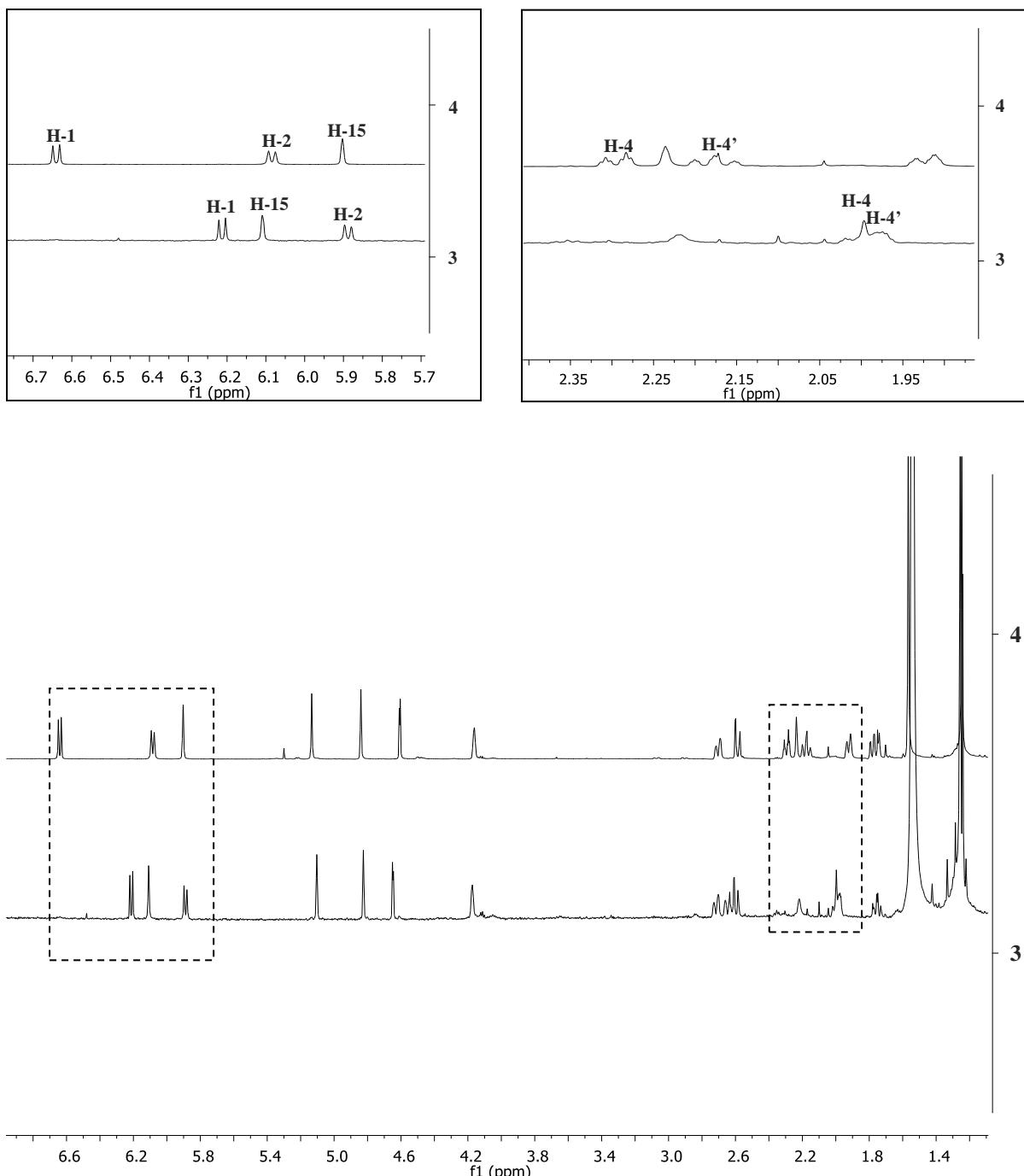
**Figura II.13.** Espectro de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **3** identificada como (Z)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigrano-1,3(15),7(14)-trieno.



**Figura II.14.** Espectro de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **4** identificada como (*E*)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno.

A substância (*Z*)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno (**3**) foi isolada de *L. majuscula* e caracterizada pela primeira vez por SUZUKI & KUROSAWA em 1978. Em 1982 SCHMITZ e colaboradores isolaram seu diasteroisômero, o (*E*)-10,15-dibromo-9-hidroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno (**4**), da lebre do mar *A. dactylomela*, cinco anos depois o isômero *E* (**4**) também foi isolado de *L. majuscula* (SUZUKI *et al.*, 1987). Outros estudos isolaram os diasteroisômeros **3** e **4** de *L. cartilaginea* (JUAGDAN *et al.*, 1997) e *L. scoparia* (DAVYT *et al.*, 2001).

Alguns trabalhos já foram publicados descrevendo, para de ambas as substâncias, as atividades citotóxicas contra células tumorais (RASHID *et al.*, 1995), antibacteriana (VAIRAPPAN *et al.*, 2010) e anti-helmíntica contra o parasita *Nippostrongylus brasiliensis* (DAVYT *et al.*, 2001).



**Figura II.15.** Comparação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias **3** e **4**. Destacando/ampliando a zona dos hidrogênios das posições 1, 2, 4 e 15.

### SUSTÂNCIA 5: isoobtusol

A **substância 5** foi isolada como um sólido branco,  $[\alpha]_D +77$  ( $c$  0,03,  $\text{CHCl}_3$ ). No espectro de massas de alta resolução (Apêndice 24) foi observado o conjunto de íons  $m/z$  411,9834 (calc. 413,9783), 413,9796 (calc. 413,9774) e 415,9776 (calc. 415,9763) com

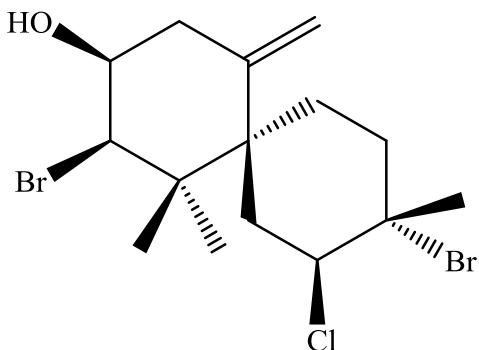
intensidade relativa 73:100:48 compatíveis com a presença de halogênios. Pelos dados de espectroscopia de massas de alta resolução pôde-se propor a fórmula molecular  $C_{15}H_{23}OBr_2Cl$ , que corresponde ao índice de insaturação igual a três, atribuído à presença de dois anéis e uma ligação dupla na estrutura.

A análise dos espectros de HSQC (Apêndice 27) revelou sinais correspondentes carbonos de diferentes naturezas: três metínicos ligados a heteroátomos a  $\delta_C$  65,2; 69,8 e 76,2; cinco metilênicos a  $\delta_C$  33,9; 33,2; 25,6; 39,4 e 113,8 e três metílicos a  $\delta_C$  25,6; 24,9 e 32,8. Os dados dos carbonos quaternários foram mesurados a partir da literatura (WESSELS *et al.*, 2000). A partir destes dados se deduz que dois graus de insaturação envolvidos na fórmula molecular são atribuídos à presença de dois ciclos na estrutura, ligados por carbono quaternário espirânico em C-6 ( $\delta_C$  44,0) e o grau de insaturação restante é devido à existência de uma ligação dupla na estrutura.

A interpretação dos dados dos experimentos de COSY (Apêndice 26), HSQC (Apêndice 27) e HMBC (Apêndice 28) e RMN  $^1H$  (Apêndice 25) permitiu atribuir os assinalamentos dos hidrogênios e carbonos  $^{13}C$  presentes na **substância 5**, tal como se observa na **Tabela II.1**.

A partir dos dados espectroscópicos de RMN, pôde-se assumir que a **substância 5** apresenta o mesmo anel A da **substância 1** ((+)-elatol), mas se diferenciando exclusivamente nas substituições dos carbonos C-2 e C-3 no anel B. Resumidamente, o anel B da **substância 5** foi caracterizado pela ausência de carbonos olefínicos e por dois carbonos quaternários nas posições entre C-2 e C-3. Assim, em relação à substância **1**, este sesquiterpeno apresenta dois carbonos halogenados ao invés de uma insaturação no anel B. Pelos dados de COSY (Apêndice 21) pôde-se determinar que o metíleno H1/H-1' está acoplado a um grupo metínico e a um cloro em  $\delta_H$  4,47 (H-2). O grupo metila C-15 ( $\delta_H$  1,92 e  $\delta_C$  32,8) está situado sobre o carbono quaternário C-3 ( $\delta_C$  71,1), que por sua vez está ligado a um heteroátomo.

Com base nos dados de RMN, no perfil de fragmentação (Apêndices 23 e 24) e rotação óptica obtido  $[\alpha]_D = +77$  ( $c$  0,03,  $CHCl_3$ ) ( $[\alpha]_D +24.8^\circ$ ,  $c$  0,48,  $CHCl_3$  *in* VAIRAPPAN *et al.*, 2001) concluiu-se que a substância **5** corresponde ao sesquiterpeno **isoobtusol** (Figura II.16) (GONZÁLEZ *et al.*, 1979a; WESSELS *et al.*, 2000; VAIRAPPAN *et al.*, 2001), isolado previamente para *L. obtusa* (GONZÁLEZ *et al.*, 1976).



**Figura II.16.** Estrutura da substância **5** identificada como isoobtusol

O isoobtusol já foi isolado de *L. majuscula* (CAPON *et al.*, 1988; DENYS *et al.*, 1992; VAIRAPPAN *et al.*, 2001b), *L. obtusa* (GONZÁLEZ *et al.*, 1976; KENNEDY *et al.*, 1988; MARTIN *et al.*, 1989) e das lebres do mar *A. dactylomela* (WESSELS *et al.*, 2000; DÍAZ-MARRERO *et al.*, 2012) e *A. parvula* (VAIRAPPAN *et al.*, 2009). Foi descrita também para esta substância as atividades antimicrobianas (GONZÁLEZ *et al.*, 1982; VAIRAPPAN, 2003; VAIRAPPAN & PHANG, 2005; DÍAZ-MARRERO *et al.*, 2012) e atividade citotóxica (VAIRAPPAN *et al.*, 2009; LANG *et al.*, 2012).

### **SUSTÂNCIA 6: obtusol**

A substância **6** foi isolada como um sólido branco. A partir do espectro de massas de baixa resolução (Apêndice 29) foi possível observar a presença de cloro e bromo pela perda de fragmentos característicos de massa 35 (Cl), 36 (HCl), 79 (Br) e 80 (HBr) a partir do íons *m/z* 315, 317 e 319.

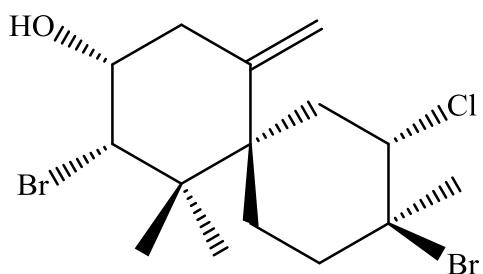
Os espectros de RMN APT (Apêndice 31), HSQC (Apêndice 34) e HMQC (Apêndice 34) permitiram identificar um total de quinze sinais: quatro de carbonos quaternários em  $\delta_C$  67,3; 50,3; 141,2 e 44,4, três de carbonos metínicos em  $\delta_C$  68,3; 71,8 e 72,1, cinco de carbonos metilênicos em  $\delta_C$  25,3; 40,7; 37,3; 38,7 e 118,0 e três de carbonos metílicos a  $\delta_C$  24,3; 20,2 e 24,1. Dentre estes sinais, dois deles correspondem a carbonos olefínicos ( $\delta_C$  117,8 e 141,2), indicando a presença de uma ligação dupla carbono-carbono do tipo  $sp^2$ , e quatro são característicos de carbonos substituídos por heteroátomos ( $\delta_C$  68,3; 67,7; 71,8 e 72,1).

A interpretação dos dados dos experimentos de COSY (Apêndice 32), HSQC (Apêndice 33) e HMBC (Apêndice 34), permitiu realizar as atribuições dos sinais de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, descritos na **Tabela II.1**.

A partir dos dados espectrocópicos de RMN, pôde-se confirmar que substância **6** apresenta a mesma estrutura plana do anel A da substância **1**, e que seu anel B é muito similar a substância **5**, se diferenciando no metileno H-1, que pelos dados de COSY (Apêndice 32) está acoplado um grupo metilenico  $\delta_H$  2,29/2,18 (H-2). O assinalamento do carbono destes grupamentos C2 ( $\delta_C$  40,7) e C1 ( $\delta_C$  25,8) foram atribuídos com os dados obtidos pelo espectro de HSQC (Apêndice 33).

O grupo metila C-15 ( $\delta_H$  1,83 e  $\delta_C$  24,1) está situado sobre o carbono quaternário C-3 ( $\delta_C$  67,7), que por sua vez também está ligado a um heteroátomo. O C-3 está acoplado a um grupo metiníco ( $\delta_H$  4,71 e  $\delta_C$  68,3) ligado a um átomo de cloro na posição. A presença dos halogênios (2 átomos bromos e 1 de cloro) descritos para a estrutura pelos dados e RMN foi confirmada através dos dados de espectroscopia de massas de baixa resolução, onde se verificou a presença de fragmentos gerados pela perda de HCl [M-36]<sup>+</sup> e HBr [M-80]<sup>+</sup> (Apêndice 29).

A análise dos resultados obtidos e a comparação com os dados da literatura permitiram identificar a substância **6** como o sesquiterpeno **obtusol** (Figura II.17), isolado inicialmente de *L. obtusa* (GONZÁLEZ *et al.*, 1979b) e identificado também em *L. dendroidea* (MACHADO *et al.*, 2011), *L. majuscula* (CAPON *et al.*, 1988; DÍAZ-MARRERO *et al.*, 2009), *L. scoparia* (DAVYT *et al.*, 2001) e também no molusco da espécie *A. dactylomela* (WESSELS *et al.*, 2000).



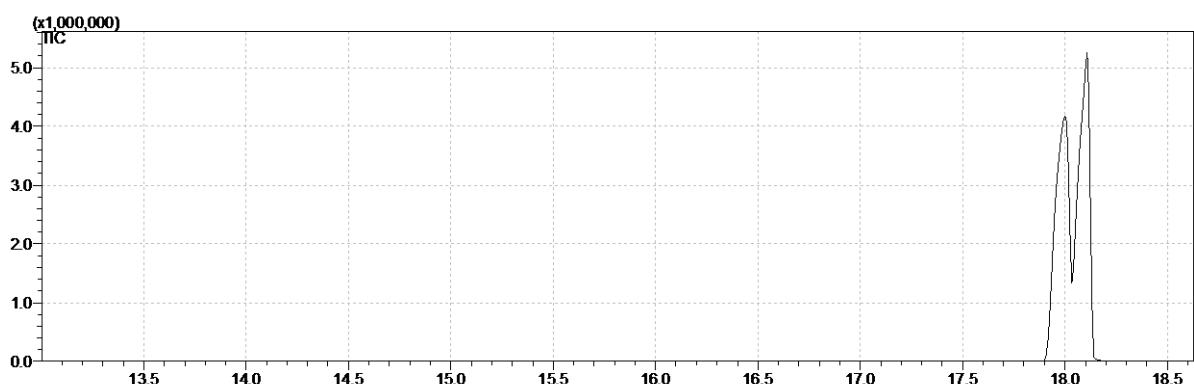
**Figura II.17.** Estrutura da substância **6** identificada como obtusol

Estudos já evidenciaram para o obtusol atividade antileishmania (MACHADO *et al.*, 2011, 2014), antibacteriana (VAIRAPPAN *et al.*, 2001a; VAIRAPPAN, 2003; DÍAZ-MARRERO *et al.*, 2012), antifúngica (DÍAZ-MARRERO *et al.*, 2012), potencial larvicida contra o mosquito *Aedes aegypti* vetor dos vírus da dengue, zica e chicungunha (SALVADOR-NETO *et al.*, 2016) e atividade citotóxica contra células tumorais (WESSELS *et al.*, 2000).

Em relação ao seu papel ecológico, GRANADO & CABELLERO (1995) demonstraram que o obtusol possui ação defensiva contra herbívoros, pois o mesmo foi capaz de reduzir o consumo pelo gastrópode *Littorina striata*.

#### **MISTURA : obtusano (7) + nidificeno (8)**

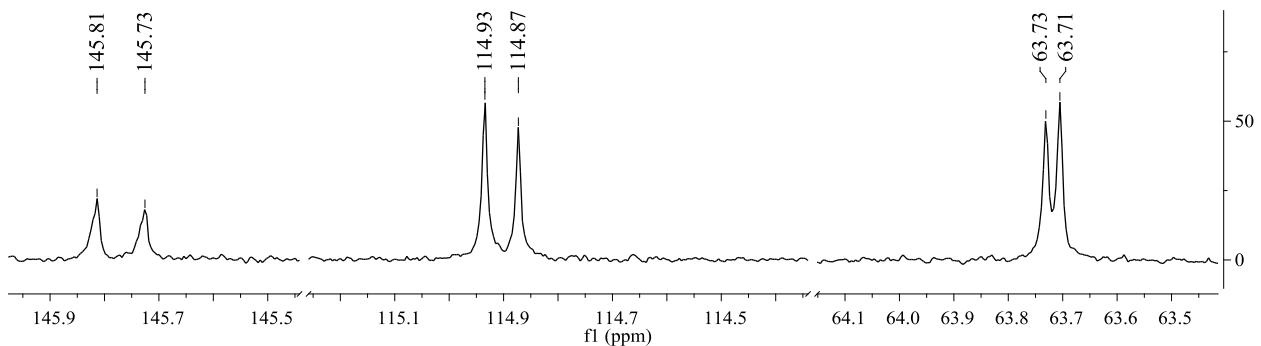
O cromatograma obtido por CG/EM da amostra (Figura II.18) revelou a presença de duas substâncias com espectros de massas semelhantes (Apêndices 35 e 36). Em ambos os espectros (EI-MS), obtidos a partir do cromatograma de íons totais por CG/EM, estavam presentes um conjunto de íons  $m/z$  396 [M]<sup>+</sup>, 398 [M+2]<sup>+</sup> e 400 [M+4]<sup>+</sup> com intensidades relativas compatíveis com a presença de átomos de bromo e um de cloro na estrutura, o que permitiu propor fórmula molecular C<sub>15</sub>H<sub>23</sub>Br<sub>2</sub>Cl com um índice de insaturação igual a três para ambas as substâncias.



**Figura II.18.** Cromatograma de CG/EM da mistura obtida

A expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C (Figura II.19 e Anexo 38) confirmou uma mistura pela presença de dois grupos principais de sinais de carbonos olefínicos pares em  $\delta_{\text{C}}$  145,8/145,7 ppm e  $\delta_{\text{C}}$  114,9/114,9 ppm, também observados na região de carbonos halogenados em  $\delta_{\text{C}}$  63,73/ 63,71 ppm, indicando que a amostra em questão trata-se de uma mistura formada predominantemente por dois

componentes. Esse constatação foi confirmada com a determinação das integrações dos sinais nos espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Apêndice 37)



**Figura II.19.** Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da mistura obtida.

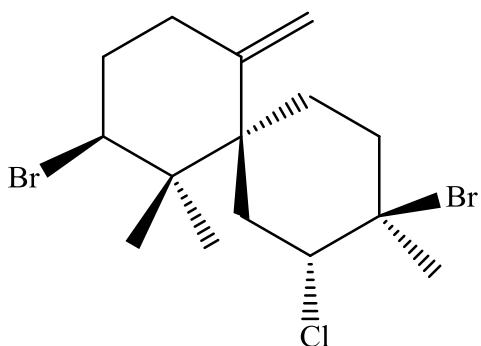
A interpretação dos dados dos experimentos de COSY (Apêndice 39), HSQC (Apêndice 40) e HMBC (Apêndice 41), permitiu realizar as atribuições dos sinais de RMN  $^1\text{H}$  (Apêndice 37) e  $^{13}\text{C}$  (Apêndice 38), para os dois componentes da mistura, como descritos na **Tabela II.1**.

A análise detalhada das correlações no espectro de HSQC (Apêndice 40) permitiu estabelecer as conexões entre os carbonos e seus respectivos hidrogênios e carbonos, e a partir destes dados pôde-se determinar que os dois componentes da mistura se tratavam de substâncias muito semelhantes estruturalmente, apresentando a mesma estrutura plana para o anel A, mas se diferenciando nas substituições nas posições 2, 3 e 4 do anel B. O anel A dessas substâncias se assemelha ao proposto para a substância **1**, mas pelo espectro de HSQC (Apêndice 35) observou-se que os sinais de hidrogênio do grupamento da posição 9 correspondem a um grupamento metilênico para ambas as substâncias da mistura C-9  $\delta_{\text{C}}=35,9$  e H-9  $\delta_{\text{H}}=1,98$  ( $J=2\text{H}/2,25$  ( $J=2\text{H}$ )).

No anel B da substância **7**, pelos dados de HMBC (Apêndice 26), os H-1'/H-1 se conectam com um carbono metil  $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}=68,0/4,72$  (C-2) que pelo seu deslocamento no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (H-2) está ligado a um heteroátomo de cloro. O grupo metila C-15 ( $\delta_{\text{H}}=1,83$  e  $\delta_{\text{C}}=25,6$ ) está situado sobre o carbono quaternário C-3 ( $\delta_{\text{C}}=68,5$ ), que por sua vez também está ligado a um heteroátomo de bromo. A análise detalhada de todas as correlações de RMN, os dados de fragmentação de massas e a comparação com dados da literatura

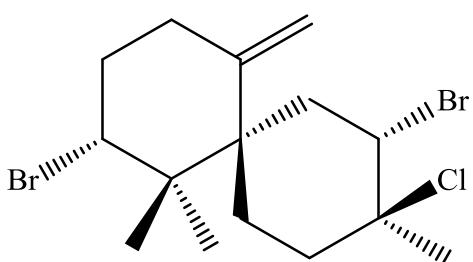
(GONZÁLEZ *et al.*, 1979b; FURUSAKI *et al.*, 1983) permitiram identificar a substância **7** da mistura como o sesquiterpeno **obtusano** (Figura III.20). Por estar em mistura não foi possível analisar a rotação óptica.

O (+)-obtusano foi isolado inicialmente de *L. obtusa* (GONZÁLEZ *et al.*, 1979b) e também já foi isolado *L. dendroidea* (MACHADO *et al.*, 2011, 2014, 2016), enquanto o (-)-obtusano foi isolado de *L. nipponica* (FURUSAKI *et al.*, 1983).



**Figura II.20.** Estrutura da substância **7** identificada como obtusano.

Em relação à **substância 8**, notou-se, através do espectro de  $^{13}\text{C}$  (Apêndice 38), que o anel B se assemelha ao da **substância 6**, porém, os sinais referentes aos carbonos halogenados do anel B do obtusol foram substituídos pelos sinais em  $\delta_{\text{C}}$  72,0 e 61,5 ppm nas posições C-3 e C-4, indicando que a substância **8** apresentava uma inversão na posição dos halogênios do anel B de sua estrutura. A análise dos espectros de COSY (Apêndice 39), HMBC (Apêndice 41) e a comparação da estrutura proposta com os dados descritos na literatura, permitiram identificar a segunda substância (**8**) da mistura como o **nidificeno** (Figura III.21), isolado anteriormente de *L. nidifica* (WARASZKIEWICZ & ERICKSON, 1974) e posteriormente da espécie *L. dendroidea* (MACHADO *et al.*, 2016).



**Figura II.21.** Estrutura da substância **8** identificada como nidificeno.

O obtusano e o nidificeno já foram isolados de espécies de *L. composita* (JI *et al.*, 2008), *L. mariannensis* (JI *et al.*, 2007c), *L. okamurai* (LI *et al.*, 2012a) e *L. obtusa* (BRITO *et al.*, 2002). Já da espécies *L. decumbens* (JI *et al.*, 2007a), *L. majuscula* (CAPON *et al.*, 1988) e *L. scoparia* (DAVYT *et al.*, 2001) foi isolado somente o obtusano. Da espécie *L. nippnica* (SUZUKI *et al.*, 1983) e do molusco *A. dactylomela* (MPHAIL *et al.*, 1999) foi isolado o nidificeno.

Entre as atividades biológicas descritas para o obtusano estão o potencial antibacteriano e anti-inflamatório (MACHADO *et al.*, 2014), além de atividade anti-helmíntica (DAVYT *et al.*, 2001). Para o nidificeno foi descrita a atividade contra o vírus da herpes tipo 1 ou HSV-1 (KIMURA *et al.*, 1999).

#### **SUBSTÂNCIA 9: 3,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno**

A substância **9** foi isolada como um óleo incolor,  $[\alpha]_D$  -36.19 (*c* 0,008, MeOH). No espectro de massas de baixa resolução, obtido através de impacto de elétrons (Apêndice 42), foi observado um conjunto de íons em *m/z* 317 [M]+, 319 [M+2]+ e 321 [M+4]+ com intensidades relativas compatíveis com a presença de halogênios.

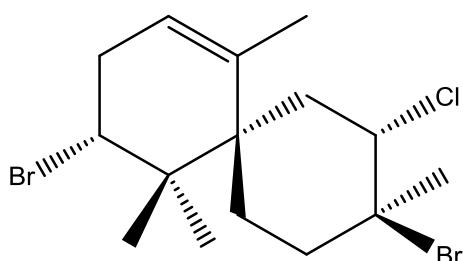
A partir dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Apêndice 44) e HSQC (Apêndice 46) foi possível identificar quinze átomos de carbono na estrutura, atribuídos a quatro carbonos quaternários  $\delta_{\text{C}}$  68,0; 47,4; 139,8; 43,1; três carbonos metínicos  $\delta_{\text{C}}$  69,6; 123,1 e 43,1; quatro de carbonos metilênicos a  $\delta_{\text{C}}$  31,8; 42,4, 38,1; e 36,4 e quatro carbonos metílicos a  $\delta_{\text{C}}$  24,7; 17,3; 26,4 e 24,1. Estes resultados, juntamente com o padrão de halogenação presente no espectro de massas, indicaram a fórmula molecular  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{Br}_2\text{Cl}$ , com índice de deficiência de hidrogênio igual a três.

A interpretação dos dados dos experimentos de COSY (Apêndice 45), HSQC (Apêndice 46) e HMBC (Apêndice 47), permitiu realizar as atribuições dos sinais de RMN  $^1\text{H}$  (Anexo 43) e  $^{13}\text{C}$  (Apêndice 44) para os dois componentes da mistura, como descritos na tabela II.1.

A partir das análises dos espectros de RMN, observou-se que o anel A da substância **9** se assemelhava ao das substâncias **7** e **8**, mas com os dados da correlação de COSY (Apêndice 45) e HSQC (Apêndice 46), foi possível propor que o grupamento metílico C-7 foi

substituído por uma instauração do tipo endo (C7  $\delta_{\text{C}}$  139,8 com C8  $\delta_{\text{C}}$  123,1). E pelo dados de HMBC, observou-se que o C-7 encontra-se ligado a um grupo metílico na posição 14 ( $\delta_{\text{C}}$  26,24 e  $\delta_{\text{H}}$  1,25).

A fórmula molecular ( $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{Br}_2\text{Cl}$ ), o padrão de fragmentação, juntamente com os dados de RMN e rotação óptica, comparados com dados da literatura, indicaram que a substância isolada trata-se do **3,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno** (Figura 22), isolado previamente de *A. dactylomela* (DIAS *et al.*, 2005) e *L. dendroidea* (MACHADO, 2014).



**Figura II. 22.** Estrutura da substância **9** identificada como 3,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno

Neste trabalho foram caracterizadas 9 sesquiterpenos do tipo chamigrano halogenado, contendo átomos bromo e cloro em suas estruturas, reiterando que macroalgas marinhas do gênero *Laurencia* são conhecidas pela produção de sesquiterpenos polihalogenados (WANG *et al.*, 2013). Como a água do mar é um ambiente rico em halogênio, não é surpreendente que estas espécies sejam capazes de incorporar átomos de halogênio nas moléculas orgânicas que produzem (BUTLER & WALKER, 1993). Apesar da concentração de cloreto (546 mM) superar a de brometo (0,86 mM) no ambiente marinho, as substâncias bromadas isoladas de macroalgas deste gênero superam o número de substâncias cloradas e iodadas. Em sua maioria, as substâncias cloradas também possuem o átomo de bromo em sua estrutura (SUZUKI *et al.*, 2009), como observou-se nas substâncias isoladas neste trabalho.

As estratégias da natureza para incorporação destes halogênios em moléculas orgânicas são múltiplas e a descoberta de novas enzimas envolvidas neste processo cresceu significativamente na última década, revelando que a incorporação de halogênios às estruturas destes metabólitos é catalisada principalmente por haloperoxidases, sendo a vanádio-

haloperoxidase a enzima de maior prevalência entre macroalgas produtoras de metabólitos halogenados (BUTLER & CARTER-FRANKLIN, 2004; CARTER-FRANKLIN & BUTLER, 2004; WINTER & MOORE, 2009). Uma vez produzidos, estes metabólitos halogenados são armazenados principalmente em organelas intracelulares denominadas "*corps en cerise*" (ou corpo cereja) e, em menor grau, em vesículas encontradas no citoplasma e dentro dos cloroplastos. A partir desta organela, estas substâncias são transportadas, através de conexões tubulares membranosas, para a superfície externa do talo. Acredita-se que o transporte de vesícula para a superfície do talo tenha papel primordial na utilização das substâncias halogenadas como defesa contra herbívoros e organismos incrustantes (SALGADO *et al.*, 2008).

### Dados físicos das substâncias isoladas

*(+)-elatol (1)*: óleo amarelo;  $[\alpha]_D +79^\circ$  (*c* 0,06,  $\text{CHCl}_3$ ), lit.  $[\alpha]_D +75^\circ$  (*c* 1,01,  $\text{CHCl}_3$  *in* BRENNAN, *et al.* 1987); ESI-HRMS:  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}^{35}\text{Cl}^{79}\text{BrNa}$ ,  $\text{C}_{15}\text{H}_{22}\text{O}^{35}\text{Cl}^{81}\text{BrNa}$ ;  $[\text{M}+\text{Na}] m/z$ : 355,0443, 357,0435 (calc. 355,0440, 357,0420) (ratio 100:94). As demais propriedades espectrais listadas na tabela II.1 estão de acordo com dados publicados (SIMS & WING, 1974; BRENNAN *et al.*, 1987).

*10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno (2)*: óleo incolor;  $[\alpha]_D -125^\circ$  (*c* 0,008,  $\text{CHCl}_3$ ), lit.  $[\alpha]_D -110^\circ$  (*c* 0,20,  $\text{CHCl}_3$  *in* VAIRAPPAN *et al.* 2001); ESI-HRMS:  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}^{79}\text{BrONa}$ ,  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}^{81}\text{BrONa}$ ;  $[\text{M}+\text{Na}] m/z$ : 321,0834, 323,0807 (calc: 321,0830, 323,0810) (ratio 100:97). Todos dados espectroscópicos de RMN listados na tabela II.1 foram comparados com a literatura (VAIRAPPAN *et al.*, 2001).

*(Z)-10,15-dibromo-9-hydroxi chamigra-1,3(15),7(14)-trieno (3)*: óleo incolor;  $[\alpha]_D +10^\circ$  (*c* 0,02,  $\text{CHCl}_3$ ), lit.  $[\alpha]_D +3$  (*c* 0,002,  $\text{CHCl}_3$  *in* COLL & WRIGHT, 1989); ESI-HRMS:  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}^{79}\text{Br}_2\text{Na}$ ,  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}^{79}\text{Br}^{81}\text{BrNa}$ ,  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}^{81}\text{Br}_2\text{Na}$ ;  $[\text{M}+\text{Na}] m/z$ : 396,9779, 398,9756, 400,9749 (calc. 396,9779, 398,9758, 400,9738) (ratio 49:100:51). Todos dados espectroscópicos de RMN listados na tabela II.1 foram comparados com os relatados na literatura (SUZUKI & KUROSAWA, 1978; COLL & WRIGHT, 1989).

*(E)-10,15-dibromo-9-hidroxi chamigra-1,3(15),7(14)-trieno (4):* óleo incolor;  $[\alpha]_D$  -31° (*c* 0.016, CHCl<sub>3</sub>), lit.  $[\alpha]_D$  -40 (*c* 0.002, CHCl<sub>3</sub> *in* COLL & WRIGHT, 1989); ESI-HRMS: C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sup>79</sup>Br<sub>2</sub>Na, C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sup>79</sup>Br<sup>81</sup>BrNa, C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sup>81</sup>Br<sub>2</sub>Na; [M+Na] *m/z*: 396,9784, 398,9761, 400,9756 (calc. 396,9779, 398,9758, 400,9738) (ratio 48:100:52). Demais dados físicos de RMN descritos na tabela II.1 comparáveis aos descritos na literatura (COLL & WRIGHT, 1989).

*isoobtusol (5):* cristal branco;  $[\alpha]_D$  +77 (*c* 0.03, CHCl<sub>3</sub>), lit.  $[\alpha]_D$  +24.8° (*c* 0.48, CHCl<sub>3</sub> *in* VAIRAPPAN *et al.* 2001); ESI-HRMS: C<sub>15</sub>H<sub>23</sub><sup>79</sup>Br<sup>81</sup>Br<sup>35</sup>ClONa, C<sub>15</sub>H<sub>23</sub><sup>79</sup>Br<sub>2</sub><sup>35</sup>ClONa e C<sub>15</sub>H<sub>23</sub><sup>81</sup>Br<sub>2</sub><sup>35</sup>ClONa, [M+Na] *m/z*: 434,9732, 436,9694, 438,9674) (Calc. 434,9721, 436,9700, 438,9670) (ratio 48:100:73). Demais dados físicos de RMN descritos na tabela II.1 foram comparados a literatura (WESSELS *et al.*, 2000).

*obtusol (6):* cristal branco;  $[\alpha]_D$  + 9,61 (*c* 0.05, CHCl<sub>3</sub>), lit.  $[\alpha]_D$  +33° (*in* GONZALEZ, *et al.* 1979). Demais dados físicos de RMN descritos na tabela II.1 foram comparados com os já relatados (CAPON *et al.*, 1988).

*3,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno (9):* óleo incolor;  $[\alpha]_D$  -36,19 (*c* 0.05, MeOH); lit.  $[\alpha]_D$  -210.2° (*c* 0.033, CHCl<sub>3</sub>, *in* DIAS *et al.* 2005). Demais dados físicos de RMN descritos na tabela II.1 foram comparados com os já relatados (DIAS *et al.*, 2005).

## II. 4. REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-ENAZI, N. M.; AL-HOMAIDAN, A. A.; IBRAHEEM, I. B. M.; AL-OTHMAN, M. R.; HATAMLEH, A. A. **2015**. Antibacterial  $\beta$ -amyrin isolated from *Laurencia microcladia*. *Arabian Journal of Chemistry*, 8: 32–37.
- ALARIF, W. M.; AL-FOOTY, K. O.; ZUBAIR, M. S.; HALID PH, M.; GHANDOURAH, M. A.; BASAIF, S. A.; AL-LIHAIBI, S. S.; AYYAD, S.-E. N.; BADRIA, F. A. **2016**. The role of new eudesmane-type sesquiterpenoid and known eudesmane derivatives from the red alga *Laurencia obtusa* as potential antifungal–antitumour agents. *Natural Product Research*, 30: 1150–1155.
- ALARIF, W. M.; AL-LIHAIBI, S. S.; AYYAD, S.-E. N.; ABDEL-RHMAN, M. H.; BADRIA, F. A. **2012**. Laurene-type sesquiterpenes from the red sea red alga *Laurencia obtusa* as potential antitumor–antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 55: 462–466.
- ANAND, N.; RACHEL, D.; THANGARAJU, N.; ANANTHARAMAN, P. **2016**. Potential of marine algae (seaweeds) as source of medicinally important compounds. *Plant Genetic Resources*, 14: 303–313.

- ARGANDOÑA, V. H.; SAN-MARTÍN, A.; ROVIROSA, J. **1993**. Halogenated sesquiterpenes pacifenol and pacifenol derivatives on the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry*, 32: 1159–1161.
- BANSEMIR, A.; JUST, N.; MICHALIK, M.; LINDEQUIST, U.; LALK, M. **2004**. Extracts and sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia chondrioides* with antibacterial activity against fish and human pathogenic bacteria. *Chemistry & biodiversity*, 1: 463–467.
- BERENBAUM, M. R. **1995**. The chemistry of defense: theory and practice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92: 2–8.
- BIANCO, É. M.; KRUG, J. L.; ZIMATH, P. L.; KROGER, A.; PAGANELLI, C. J.; BOEDER, A. M.; DOS SANTOS, L.; TENFEN, A.; RIBEIRO, S. M.; KUROSHIMA, K. N.; ALBERTON, M. D.; DE CORDOVA, C. M. M.; REBELO, R. A. **2015**. Antimicrobial (including antimolluscites), antioxidant and anticholinesterase activities of brazilian and spanish marine organisms – Evaluation of extracts and pure compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25: 668–676.
- BIANCO, E. M.; PIRES, L.; SANTOS, G. K. N.; DUTRA, K. A.; REIS, T. N. V.; VASCONCELOS, E. R. T. P. P.; COCENTINO, A. L. M.; NAVARRO, D. M. A. F. **2013**. Larvicidal activity of seaweeds from northeastern Brazil and of a halogenated sesquiterpene against the Dengue mosquito (*Aedes aegypti*). *Industrial Crops and Products*, 43: 270–275.
- BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H. G.; PRINSEP, M. R. **2017**. Marine Natural Products. *Natural Product Reports*, 34: 235–294.
- BORN, F. S.; BIANCO, E. M.; DA CAMARA, C. A. G. **2012**. Acaricidal and repellent activity of terpenoids from seaweeds collected in Pernambuco, Brazil. *Natural Product Communications*, 7: 463–466.
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. **2001**. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161: 839–851.
- BRENNAN, M. R.; ERICKSON, K. L.; MINOTT, D. A.; PASCOE, K. O. **1987**. Chamigrane metabolites from a Jamaican variety of *Laurencia obtusa*. *Phytochemistry*, 26: 1053–1057.
- BRITO, I.; CUETO, M.; DÍAZ-MARRERO, A. R.; DARIAS, J.; SAN MARTÍN, A. **2002**. Oxachamigrenes, new halogenated sesquiterpenes from *Laurencia obtusa*. *Journal of Natural Products*, 65: 946–948.
- BUTLER, A.; CARTER-FRANKLIN, J. N. **2004**. The role of vanadium bromoperoxidase in the biosynthesis of halogenated marine natural products. *Natural Product Reports*, 21: 180 - 188.
- BUTLER, A.; WALKER, J. V. **1993**. Marine haloperoxidases. *Chemical Reviews*, 93; 1937–1944.
- CALEGARIO, G.; POLLIER, J.; ARENDT, P.; DE OLIVEIRA, L. S.; THOMPSON, C.; SOARES, A. R.; PEREIRA, R. C.; GOOSSENS, A.; THOMPSON, F. L. **2016**. Cloning and functional characterization of cycloartenol synthase from the red seaweed *Laurencia dendroidea*. *PLoS ONE*, 11: e0165954.
- CAMPOS, A.; SOUZA, C. B.; LHULLIER, C.; FALKENBERG, M.; SCHENKEL, E. P.; RIBEIRO-DO-VALLE, R. M.; SIQUEIRA, J. M. **2012**. Anti-tumour effects of elatol, a marine derivative compound obtained from red algae *Laurencia microcladia*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64: 1146–1154.
- CAPON, R. J.; GHISALBERTI, E. L.; MORI, T. A.; JEFFERIES, P. R. **1988**. Sesquiterpenes from *Laurencia* spp. *Journal of Natural Products*, 51: 1302–1304.

- CARTER-FRANKLIN, J. N.; BUTLER, A. **2004**. Vanadium bromoperoxidase-catalyzed biosynthesis of halogenated marine natural products. *Journal of the American Chemical Society*, 126: 15060–15066.
- CASSANO, V.; METTI, Y.; MILLAR, A. J. K.; GIL-RODRÍGUEZ, M. C.; SENTÍES, A.; DÍAZ-LARREA, J.; OLIVEIRA, M. C.; FUJII, M. T. **2012**. Redefining the taxonomic Status of *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil and the Canary Islands. *European Journal of Phycology*, 47: 67–81.
- CEN-PACHECO, F.; SANTIAGO-BENÍTEZ, A. J.; GARCÍA, C.; ÁLVAREZ-MÉNDEZ, S. J.; MARTÍN-RODRÍGUEZ, A. J.; NORTE, M.; MARTÍN, V. S.; GAVÍN, J. A.; FERNÁNDEZ, J. J.; DARANAS, A. H. **2015**. Oxasqualenoids from *Laurencia viridis*: Combined spectroscopic–computational analysis and antifouling potential. *Journal of Natural Products*, 78: 712–721.
- CHATTER, R.; KLADI, M.; TARHOUNI, S.; MAATOUG, R.; KHARRAT, R.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. **2009**. Neorogioltriol: A brominated diterpene with analgesic activity from *Laurencia glandulifera*. *Phytochemistry Letters*, 2: 25–28.
- CHATTER, R.; OTHMAN, R. B.; RABHI, S.; KLADI, M.; TARHOUNI, S.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V.; GUIZANI-TABBANE, L.; KHARRAT, R. **2011**. *In vivo* and *in vitro* anti-inflammatory activity of neorogioltriol, a new diterpene extracted from the red algae *Laurencia glandulifera*. *Marine Drugs*, 9: 1293–1306.
- CHEN, J.-Y.; HUANG, C.-Y.; LIN, Y.-S.; HWANG, T.-L.; WANG, W.-L.; CHIOU, S.-F.; SHEU, J.-H. **2016**. Halogenated sesquiterpenoids from the red alga *Laurencia tristicha* collected in taiwan. *Journal of Natural Products*, 79: 2315–2323.
- CHRISTOPHERSEN, C. **1995**. Theory of the origin, function, and evolution secondary metabolites. In: *Studies in Natural Products Chemistry*. [s.l.] Elsevier. 81p. 677–737.
- COLL, J.; WRIGHT, A. **1989**. Tropical marine algae. III. New sesquiterpenes from *Laurencia majuscula* (Rhodophyta, Rhodophyceae, Ceramiales, Rhodomelaceae). *Australian Journal of Chemistry*, 42: 1591.
- CORDELL, G. A. **1976**. Biosynthesis of sesquiterpenes. *Chemical Reviews*, 76 (4): 425–460.
- DA GAMA, B. A. P.; PEREIRA, R. C.; CARVALHO, A. G. V.; COUTINHO, R.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. **2002**. The effects of seaweed secondary metabolites on biofouling. *Biofouling*, 18: 13–20.
- DA GAMA, B. A. P.; PEREIRA, R. C.; SOARES, A. R.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. **2003**. Is the mussel test a good indicator of antifouling activity? A comparison aetween aaboratory and field assays. *Biofouling*, 19: 161–169.
- DA GAMA, B. A. P.; PLOUGUERNÉ, E.; PEREIRA, R. C. **2014**. The antifouling defence mechanisms of marine Mmcroalgae. In: *Advances in Botanical Research*. [s.l.] Elsevier. 71p. 413–440.
- DAVYT, D.; FERNANDEZ, R.; SUESCUN, L.; MOMBRÚ, A. W.; SALDAÑA, J.; DOMÍNGUEZ, L.; COLL, J.; FUJII, M. T.; MANTA, E. **2001**. New sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia S Coparia*: Isolation, structure determination, and anthelmintic activity <sup>1</sup>. *Journal of Natural Products*, 64: 1552–1555.
- DAVYT, D.; FERNANDEZ, R.; SUESCUN, L.; MOMBRÚ, A. W.; SALDAÑA, J.; DOMÍNGUEZ, L.; FUJII, M. T.; MANTA, E. **2006**. Bisabolanes from the red alga *Laurencia scoparia*. *Journal of Natural Products*, 69: 1113–1116.
- DE NYS, R.; LEYA, T.; MAXIMILIEN, R.; AFSAR, A.; NAIR, P. S. R.; STEINBERG, P. D. **1996**. The need for standardised broad scale bioassay testing: A case study using the red alga *Laurencia rigida*. *Biofouling*, 10: 213–224.

- DE OLIVEIRA, L.; GREGORACCI, G.; SILVA, G. G.; SALGADO, L.; FILHO, G.; ALVES-FERREIRA, M.; PEREIRA, R.; THOMPSON, F. L. **2012**. Transcriptomic analysis of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Florideophyceae, Rhodophyta) and its microbiome. *BMC Genomics*, 13: 487.
- DE OLIVEIRA, L.; TSCHOEKE, D.; DE OLIVEIRA, A.; HILL, L.; PARADAS, W.; SALGADO, L.; THOMPSON, C.; PEREIRA, R.; THOMPSON, F. **2015**. New Insights on the Terpenome of the Red Seaweed *Laurencia dendroidea* (Florideophyceae, Rhodophyta). *Marine Drugs*, 13:879–902.
- DELLAI, A.; LAAJILI, S.; LE MORVAN, V.; ROBERT, J.; BOURAOUI, A. **2013**. Antiproliferative activity and phenolics of the mediterranean seaweed *Laurencia obusta*. *Industrial Crops and Products*, 47: 252–255.
- DENYS, R.; COLL, J. C.; BOWDEN, B. F. 1992. Tropical marine algae. VIII. The structural determination of novel sesquiterpenoid metabolites from the red alga *Laurencia majuscula*. *Australian Journal of Chemistry*, 45: 1611–1623.
- DESOTI, V. C.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; SUDATTI, D. B.; PEREIRA, R. C.; ALONSO, A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V.; DE OLIVEIRA SILVA, S. **2012**. Trypanocidal action of (-)-elatol involves an oxidative stress triggered by *Mitochondria dysfunction*. *Marine Drugs*, 10: 1631–1646.
- DESOTI, V.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; SUDATTI, D.; PEREIRA, R.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.; DE OLIVEIRA SILVA, S. **2014**. Additional Evidence of the Trypanocidal Action of (-)-elatol on amastigote forms through the involvement of reactive oxygen species. *Marine Drugs*, 12: 4973–4983.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. **2012**. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites*, 2: 303–336.
- DIAS, T.; BRITO, I.; MOUJIR, L.; PAIZ, N.; DARIAS, J.; CUETO, M. **2005**. Cytotoxic sesquiterpenes from *Aplysia dactylomela*. *Journal of Natural Products*, 68: 1677–1679.
- DÍAZ-MARRERO, A. R.; BRITO, I.; DE LA ROSA, J. M.; D'CROZ, L.; FABELO, O.; RUIZ-PÉREZ, C.; DARIAS, J.; CUETO, M. **2009**. Novel lactone chamigrene-derived metabolites from *Laurencia majuscula*. *European Journal of Organic Chemistry*, 2009: 1407–1411.
- DÍAZ-MARRERO, A.-R.; DE LA ROSA, J. M.; BRITO, I.; DARIAS, J.; CUETO, M. **2012**. Dactylomelatriol, a biogenetically intriguing omphalane-derived marine sesquiterpene. *Journal of Natural Products*, 75: 115–118.
- DU, B.; ZHONG, X.; LIAO, X.; XU, W.; ZHOU, X.; XU, S. A. **2010**. New antitumor arabinopyranoside from *Laurencia majuscula* induces G2/M cell cycle arrest. *Phytotherapy Research*, 24: 1447–1450.
- EL-HOSSARY, E. M.; CHENG, C.; HAMED, M. M.; EL-SAYED HAMED, A. N.; OHLSEN, K.; HENTSCHEL, U.; ABDELMOHSEN, U. R. **2017**. Antifungal potential of marine natural products. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 126: 631–651.
- FENG, M.-T.; YU, X.-Q.; YANG, P.; YANG, H.; LIN, K.; MAO, S.C. **2015**. Two new antifungal polyunsaturated fatty acid ethyl esters from the red alga *Laurencia okamurae*. *Chemistry of Natural Compounds*, 51: 418–422.
- 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.
- FERNANDO, I. P. S.; NAH, J.-W.; JEON, Y.-J. **2016**. Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 48: 22–30.

- FIRN, R. D.; JONES, C. G. **2009**. A Darwinian view of metabolism: molecular properties determine fitness. *Journal of Experimental Botany*, 60: 719–726.
- FREILE-PELEGRIN, Y.; ROBLEDO, D.; CHAN-BACAB, M. J.; ORTEGA-MORALES, B. O. **2008**. Antileishmanial properties of tropical marine algae extracts. *Fitoterapia*, 79: 374–377.
- FURUSAKI, A.; MATSUMOTO, T.; KURATA, K.; SUZUKI, T.; SUZUKI, M.; KUROSAWA, E. **1983**. X-Ray structure determination of (-)-obtusane, a new sesquiterpene from the red alga *Laurencia nipponica* Yamada. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 56: 3501–3502.
- FUJII, M.T.; CASSANO, V.; STEIN, E.M.; CARVALHO, L.R. **2011**. Overview of the taxonomy and of the major secondary metabolites and their biological activities related to human health of the *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21: 268–282.
- GARSON, M. J. **2010**. Marine natural products as antifeedants. In: *Comprehensive Natural Products II*. [s.l.] Elsevier, p. 503–537.
- GERWICK, W. H.; LOPEZ, A.; DAVILA, R.; ALBORS, R. **1987**. Two new chamigrene sesquiterpenoids from the tropical red alga *Laurencia obtusa*. *Journal of Natural Products*, 50: 1131–1135.
- GHEDA, S. F.; EL-ADAWI, H. I.; EL-DEEB, N. M. **2016**. Antiviral profile of brown and red seaweed polysaccharides against hepatitis C virus. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 15: 483.
- GOGINENI, V.; SCHINAZI, R. F.; HAMANN, M. T. **2015**. Role of marine natural products in the genesis of antiviral agents. *Chemical Reviews*, 115: 9655–9706.
- GONZÁLEZ, A. G.; DARIAS, J.; DÍAZ, A.; FOURNERON, J. D.; MARTÍN, J. D.; PÉREZ, C. **1976**. Evidence for the biogenesis of halogenated chamigrenes from the red alga *Laurencia obtusa*. *Tetrahedron Letters*, 17: 3051–3054.
- GONZÁLEZ, A. G.; DARIAS, V.; ESTÉVEZ, E. **1982**. Chemotherapeutic activity of polyhalogenated terpenes from Spanish algae. *Planta Medica*, 44: 44–46.
- GONZÁLEZ, A. G.; MARTÍN, J. D.; MARTÍN, V. S.; MARTÍNEZ-RIPOLL, M.; FAYOS, J. **1979a**. X Ray study of sesquiterpene constituents of the alga *Laurencia obtusa* leads to structure revision. *Tetrahedron Letters*, 20: 2717–2718.
- GONZÁLEZ, A. G.; MARTÍN, J. D.; MARTÍN, V. S.; NORTE, M. **1979b**. Carbon-13 NMR application to *Laurencia* polyhalogenated sesquiterpenes. *Tetrahedron Letters*, 20: 2719–2722.
- GUTIÉRREZ-CEPEDA, A.; FERNÁNDEZ, J. J.; NORTE, M.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, M.; BRITO, I.; MULLER, C. D.; SOUTO, M. L. **2016**. Additional insights into the obtusallene family: Components of *Laurencia marilzae*. *Journal of Natural Products*, 79: 1184–1188.
- HÄDER, D.-P.; WILLIAMSON, C. E.; WÄNGBERG, S.-Å.; RAUTIO, M.; ROSE, K. C.; GAO, K.; HELBLING, E. W.; SINHA, R. P.; WORREST, R. **2015**. Effects of UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with other environmental factors. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 14: 108–126.
- HARIZANI, M.; IOANNOU, E.; ROUSSIS, V. **2016**. The *Laurencia* paradox: An endless source of chemodiversity. In: KINGHORN, A. D.; FALK, H.; GIBBONS, S.; KOBAYASHI, J. 'ICHI (Ed.). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 102*. Cham: Springer International Publishing, 102p. 91–252.
- HASLAM, E. **1994**. Secondary metabolism—evolution and function: Products or processes? *Chemoecology*, 5: 89–95.

- HAY, M. E. **1996**. Marine chemical ecology: what's known and what's next? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 200: 103–134.
- HAY, M. E. **2009**. Marine chemical ecology: Chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, 1: 193–212.
- HAY, M. E.; FENICAL, W. **1996**. Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea. *Oceanography*, 9: 10–20.
- HAY, M. E.; FENICAL, W.; GUSTAFSON, K. **1987**. Chemical defense against diverse coral-reef herbivores. *Ecology*, 68: 1581–1591.
- HELLIO, C.; BERGE, J. P.; BEAUPOIL, C.; LE GAL, Y.; BOURGOUGNON, N. **2002**. Screening of marine algal extracts for anti-settlement activities against microalgae and macroalgae. *Biofouling*, 18: 205–215.
- HIGGS, M. D. **1981**. Antimicrobial components of the red alga *Laurencia hybrida* (Rhodophyta, Rhodomelaceae). *Tetrahedron*, 37: 4255–4258.
- HOWARD, B. M.; NOMURA, A. M.; FENICAL, W. Chemotaxonomy in marine algae: secondary metabolite synthesis by *Laurencia* in unialgal culture. *Biochemical Systematics and Ecology*, 8: 329–336.
- ILIOPOULOU, D.; MIHOPOULOS, N.; VAGIAS, C.; PAPAZAFIRI, P.; ROUSSIS, V. **2003**. Novel cytotoxic brominated diterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. *The Journal of Organic Chemistry*, 68: 7667–7674.
- JI, N.-Y.; LI, X.-M.; CUI, C.-M.; WANG, B.-G. **2007a**. Terpenes and polybromoindoles from the marine red alga *Laurencia decumbens* (Rhodomelaceae). *Helvetica Chimica Acta*, 90 (9): 1731–1736.
- JI, N.-Y.; LI, X.-M.; DING, L.-P.; WANG, B.-G. **2007b**. Aristolane sesquiterpenes and highly brominated indoles from the marine red alga *Laurencia similis* (Rhodomelaceae). *Helvetica chimica acta*, 90: 385–391.
- JI, N.-Y.; LI, X.-M.; DING, L.-P.; WANG, B.-G. **2016**. Halogenated eudesmane derivatives and other terpenes from the marine red alga *Laurencia pinnata* and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 64: 1–5.
- JI, N.-Y.; LI, X.-M.; LI, K.; DING, L.-P.; GLOER, J. B.; WANG, B.-G. **2007c**. Diterpenes, sesquiterpenes, and a C<sub>15</sub>-Acetogenin from the marine red alga *Laurencia mariannensis*. *Journal of Natural Products*, 70: 1901–1905.
- JI, N.-Y.; LI, X.-M.; LI, K.; GLOER, J. B.; WANG, B.-G. **2008**. Halogenated sesquiterpenes and non-halogenated linear C15-Acetogenins from the Marine red alga *Laurencia composita* and their chemotaxonomic significance. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36: 938–941.
- JUAGDAN, E. G.; KALIDINDI, R.; SCHEUER, P. **1997**. Two new chamigranes from an Hawaiian red alga, *Laurencia cartilaginea*. *Tetrahedron*, 53: 521–528.
- JUNG, W.-K.; CHOI, I.; OH, S.; PARK, S.-G.; SEO, S.-K.; LEE, S.-W.; LEE, D.-S.; HEO, S.-J.; JEON, Y.-J.; JE, J.-Y.; AHN, C.-B.; KIM, J. S.; OH, K. S.; KIM, Y.-M.; MOON, C.; CHOI, I.-W. **2009**. Anti-asthmatic effect of marine red alga (*Laurencia undulata*) polyphenolic extracts in a murine model of asthma. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 293–297.
- KAMENARSKA, Z.; STEFANOV, K.; STANCHEVA, R.; DIMITROVA-KONAKLIEVA, S.; POPOV, S. **2006**. Comparative investigation on sterols from some black sea red algae. *Natural Product Research*, 20: 113–118.
- KAVITA, K.; SINGH, V. K.; JHA, B. **2014**. 24-branched Δ5 sterols from *Laurencia papillosa* red seaweed with antibacterial activity against human pathogenic bacteria. *Microbiological Research*, 169: 301–306.

- KENNEDY, D. J.; SELBY, I. A.; THOMSON, R. H. **1988**. Chamigrane metabolites from *Laurencia obtusa* and *L. scoparia*. *Phytochemistry*, 27: 1761–1766.
- KIMURA, J.; KAMADA, N.; TSUJIMOTO, Y. **1999**. Fourteen chamigrane derivatives from a red alga, *Laurencia nidifica*. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 72: 289–292.
- KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. **1997**. *Laurencia rigida*: Chemical investigations of its antifouling dichloromethane extract. *Journal of natural products*, 60: 967–970.
- KURATA, K.; TANIGUCHI, K.; AGATSUMA, Y.; SUZUKI, M. **1998**. Diterpenoid feeding-deterrents from *Laurencia saitoi*. *Phytochemistry*, 47: 363–369.
- LAJILI, S.; AZOUAOU, S. A.; TURKI, M.; MULLER, C. D.; BOURAOUI, A. **2016**. Anti-inflammatory, analgesic activities and gastro-protective effects of the phenolic contents of the red alga *Laurencia obtusa*. *European Journal of Integrative Medicine*, 8 (3): 298–306.
- LANG, K. L.; SILVA, I. T.; ZIMMERMANN, L. A.; LHULLIER, C.; MAÑALICH ARANA, M. V.; PALERMO, J. A.; FALKENBERG, M.; SIMÓES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DURÁN, F. J. **2012**. Cytotoxic activity of semi-synthetic derivatives of elatol and isoobtusol. *Marine Drugs*, 10: 2254–2264.
- LEE, O.-H.; YOON, K.-Y.; KIM, K.-J.; YOU, S.; LEE, B.-Y. **2011**. Seaweed extracts as a potential tool for the attenuation of oxidative damage in obesity-related pathologies: antiadipogenic effect of seaweed. *Journal of Phycology*, 47: 548–556.
- LEE TAN, K.; MATSUNAGA, S.; VAIRAPPAN, C. S. **2011**. Halogenated chamigranes of red alga *Laurencia Snackeyi* (Weber-van Bosse) masuda from Sulu-Sulawesi sea. *Biochemical Systematics and Ecology*, 39: 213–215.
- LHULLIER, C.; DONNANGELO, A.; CARO, M.; PALERMO, J. A.; HORTA, P. A.; FALKENBERG, M.; SCHENKEL, E. P. **2009a**. Isolation of elatol from *Laurencia microcladia* and its palatability to the sea urchin *Echinometra lucunter*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 37: 254–259.
- LHULLIER, C.; FALKENBERG, M.; IOANNOU, E.; QUESADA, A.; PAPAZAFIRI, P.; HORTA, P. A.; SCHENKEL, E. P.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. **2009b**. Cytotoxic halogenated metabolites from the Brazilian red alga *Laurencia catarinensis*. *Journal of natural products*, 73: 27–32.
- LI, H.-L.; LI, X.-M.; LIU, H.; MENG, L.-H.; WANG, B.-G. **2016a**. Two new diphenylketones and a new xanthone from talaromyces islandicus EN-501, an endophytic fungus derived from the marine red alga *Laurencia okamurai*. *Marine Drugs*, 14: 223.
- LI, M.-C.; SUN, W.-S.; CHENG, W.; LIU, D.; LIANG, H.; ZHANG, Q.-Y.; LIN, W.-H. **2016b**. Four new minor brominated indole related alkaloids with antibacterial activities from *Laurencia similis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26: 3590–3593.
- LI, X.-D.; MIAO, F.-P.; LI, K.; JI, N.-Y. **2012a**. Sesquiterpenes and acetogenins from the marine red alga *Laurencia okamurai*. *Fitoterapia*, 83: 518–522.
- LI, X.-D.; MIAO, F.-P.; YIN, X.-L.; LIU, J.-L.; JI, N.-Y. **2012b**. Sesquiterpenes from the marine red alga *Laurencia composita*. *Fitoterapia*, 83: 1191–1195.
- LI, Y.-X.; LI, Y.; LEE, S.-H.; QIAN, Z.-J.; KIM, S.-K. **2010**. Inhibitors of oxidation and matrix metalloproteinases, floridoside, and isofloridoside from marine red alga *Laurencia undulata*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 578–586.
- LIANG, H.; HE, J.; MA, A.; ZHANG, P.; BI, S.; SHI, D. **2007**. Effect of ethanol extract of alga *Laurencia* supplementation on DNA oxidation and alkylation damage in mice. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 16: 164–168.

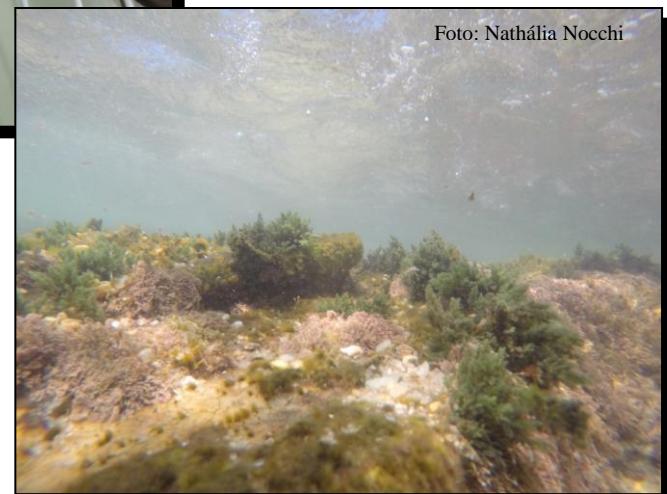
- MACHADO, F. L. da S. **2014**. Diversidade química e atividade farmacológica em algas da espécie *Laurencia dendroidea* J. Agardh. Tese (Doutorado em Sociologia) – Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro. São Paulo, p. 292.
- MACHADO, F. L. da S.; DUARTE, H. M.; SOUZA GESTINARI, L. M.; CASSANO, V.; KAISER, C. R.; SOARES, A. R. **2016**. Geographic distribution of natural products produced by red algae *Laurencia dendroidea* J. Agardh. *Chemistry & Biodiversity*, 13: 845–851.
- MACHADO, F. L. da S.; LIMA, W. P.; DUARTE, H. M.; ROSSI-BERGMANN, B.; GESTINARI, L. M.; FUJII, M. T.; KAISER, C. R.; SOARES, A. R. **2014**. Chemical diversity and antileishmanial activity of crude extracts of *Laurencia* Complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24: 635–643.
- MACHADO, F. L. da S.; PACIENZA-LIMA, W.; ROSSI-BERGMANN, B.; DE SOUZA GESTINARI, L.; FUJII, M.; CAMPOS DE PAULA, J.; COSTA, S.; LOPES, N.; KAISER, C.; SOARES, A. **2011**. Antileishmanial sesquiterpenes from the brazilian red alga *Laurencia dendroidea*. *Planta Medica*, 77: 733–735.
- MACHADO, F. L. da S.; VENTURA, T.; GESTINARI, L.; CASSANO, V.; RESENDE, J.; KAISER, C.; LASUNSKAIA, E.; MUZITANO, M.; SOARES, A. **2014**. Sesquiterpenes from the brazilian red alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh. *Molecules*, 19: 3181–3192.
- MARTIN, J. D.; CABALLERO, P.; FERNANDEZ, J. J.; NORTE, M.; PEREZ, R.; RODRIGUEZ, M. L. **1989**. Metabolites from *Laurencia obtusa*. *Phytochemistry*, 28: 3365–3367.
- MARTINS, C. D. L.; RAMLOV, F.; NOCCHI, N. P.; GESTINARI, L. M.; DOS SANTOS, B. F.; BENTO, L. M.; LHULLIER, C.; GOUVEA, L.; BASTOS, E.; HORTA, P. A.; SOARES, A. R. **2013**. Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. *Journal of Applied Phycology*, 25: 1179–1187.
- MASUDA, M.; ABE, T.; SUZUKI, T.; SUZUKI, M. **1996**. Morphological and chemotaxonomic studies on *Laurencia composita* and *L. okamurae* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia*, 35: 550–562.
- MASUDA, M.; KAWAGUCHI, S.; TAKAHASHI, Y.; OKAMOTO, K.; SUZUKI, M. **1999**. Halogenated secondary metabolites of *Laurencia similis* (Rhodomelaceae, Rhodophyta). *Botanica Marina*, 42: 199–202.
- MASUDA, M.; KOGAME, K.; ARISAWA, S.; SUZUKI, M. **1998**. Morphology and halogenated secondary metabolites of three Gran Canarian species of *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Botanica Marina*, 41: 265–278.
- MASUDA, M.; TAKAHASHI, Y.; OKAMOTO, K.; MATSUO, Y.; SUZUKI, M. **1997**. Morphology and halogenated secondary metabolites of *Laurencia snackeyi* (Weber-van Bosse) Stat. Nov. (Ceramiales, Rhodophyta). *European Journal of Phycology*, 32: 293–301.
- MENDIOLA MARTÍNEZ, J.; HERNÁNDEZ, H.; ACUÑA, D.; ESQUIVEL, M.; SCULL LIZAMA, R.; ABREU PAYROL, J. **2005**. Inhibiting activity of the in vitro growth of *Plasmodium falciparum* of extracts from algae of genus *Laurencia*. *Revista Cubana De Medicina Tropical*, 57: 192–195.
- MOLONEY, M. G. **2016**. Natural products as a source for novel antibiotics. *Trends in Pharmacological Sciences*, 37: 689–701.
- MORA, C.; TITTENSOR, D. P.; ADL, S.; SIMPSON, A. G. B.; WORM, B. **2011**. How many species are there on earth and in the Ocean? *PLoS Biology*, 9: e1001127.
- McPHAIL, K. L.; DAVIES-COLEMAN, M. T.; COPLEY, R. C. B.; EGGLESTON, D. S. **1999**. New halogenated sesquiterpenes from South African specimens of the circumtropical sea hare *Aplysia Dactylomela*. *Journal of Natural Products*, 62: 1618–1623.

- MUDIT, M.; EL SAYED, K. A. **2016**. Cancer control potential of marine natural product scaffolds through inhibition of tumor cell migration and Invasion. *Drug Discovery Today*, 21: 1745–1760.
- NEWMAN, D.; CRAGG, G. **2014**. Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. *Marine Drugs*, 12: 255–278.
- OLIVEIRA, A. S.; SUDATTI, D. B.; FUJII, M. T.; RODRIGUES, S. V.; PEREIRA, R. C. **2016**. Inter- and intrapopulation variation in the defensive chemistry of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia*, 52: 130–136.
- PACHECO, F. C.; VILLA-PULGARIN, J. A.; MOLLINEDO, F.; MARTÍN, M. N.; FERNÁNDEZ, J. J.; DARANAS, A. H. **2011**. New polyether triterpenoids from *Laurencia viridis* and their biological evaluation. *Marine Drugs*, 9: 2220–2235.
- PAL, A.; KAMTHANIA, M. C.; KUMAR, A. **2014**. Bioactive compounds and properties of seaweeds - A Review. *OALib*, 1: 1–17.
- PALANIVELOO, K.; VAIRAPPAN, C. S. **2014**. Chemical relationship between red algae genus *Laurencia* and sea hare (*Aplysia dactylomela* Rang) in the North Borneo Island. *Journal of Applied Phycology*, 26: 1199–1205.
- PAUL, V. J.; HAY, M. E. **1986**. Seaweed susceptibility to herbivory: chemical and morphological correlates. *Marine Ecology Progress Series*, 255–264.
- PAWLIK, J. R. **2012**. Antipredatory defensive roles of natural products from marine invertebrates. In: FATTORUSSO, E.; GERWICK, W. H.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O. (Ed.). *Handbook of Marine Natural Products*. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 677–710.
- PAWLIK, J. R.; AMSLER, C. D.; RITSON-WILLIAMS, R.; MCCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J.; PAUL, V. J. **2013**. Marine chemical ecology: A science born of scuba. *Research and Discoveries: The Revolution of Science through Scuba*, 39: 53–69.
- PEREIRA, R. C.; DA GAMA, B. A. P.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. **2003**. Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. *Brazilian Journal of Biology*, 63: 665–672.
- PÉREZ-RIVEROL, A.; PIÑÓN RAMOS, A.; MORIER DÍAZ, L. F.; TORRES LÓPEZ, Y.; MENDOZA LLANES, D.; DEL BARRIO ALONSO, G. **2014**. Actividad antiviral de un extracto acuoso del alga roja *Laurencia obtusa* frente a virus influenza A y B. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 66: 273–285.
- RANGEL & FALKENBERG. **2015**. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. *Journal of Coastal Life Medicine*, 3: 421–428.
- RASHID, M. A.; GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA, J. H.; BOYD, M. R. **1995**. Brominated chamigrane sesquiterpenes produce a novel profile of differential cytotoxicity in the NCI *in Vitro* Screen. *Natural Product Letters*, 6: 255–259.
- RETZ DE CARVALHO, L.; FRANCA ROQUE, N. **2004**. Correlations between primary and secondary metabolites in ceramiales (Rhodophyta). *Biochemical Systematics and Ecology*, 32: 337–342.
- REVERTÉ, L.; SOLIÑO, L.; CARNICER, O.; DIOGÈNE, J.; CAMPÀS, M. **2014**. Alternative methods for the detection of emerging marine toxins: Biosensors, biochemical assays and cell-based assays. *Marine Drugs*, 12 (12): 5719–5763.
- SALGADO, L. T.; VIANA, N. B.; ANDRADE, L. R.; LEAL, R. N.; DA GAMA, B. A. P.; ATTIAS, M.; PEREIRA, R. C.; AMADO FILHO, G. M. **2008**. Intra-cellular storage, transport and exocytosis of halogenated compounds in marine red alga *Laurencia obtusa*. *Journal of Structural Biology*, 162: 345–355.

- SALVADOR-NETO, O.; GOMES, S.; SOARES, A.; MACHADO, F.; SAMUELS, R.; NUNES DA FONSECA, R.; SOUZA-MENEZES, J.; MORAES, J.; CAMPOS, E.; MURY, F.; SILVA, J. **2016**. Larvicidal potential of the halogenated sesquiterpene (+)-obtusol, isolated from the alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales: Rhodomelaceae), against the dengue vector mosquito *Aedes Aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). *Marine Drugs*, 14: 20.
- SANTOS, A. O. dos; VEIGA-SANTOS, P.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; SUDATTI, D. B.; BIANCO, É. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. **2010**. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. *Marine Drugs*, 8: 2733–2743.
- SCHMITZ, F. J.; MICHAUD, D. P.; SCHMIDT, P. G. **1982**. Marine natural products: parguerol, deoxyparguerol, and isoparguerol. New brominated diterpenes with modified pimarane skeletons from the sea hare *Aplysia dactylomela*. *Journal of the American Chemical Society*, 104: 6415–6423.
- SHUI-CHUN, M. A. O.; YUE-WEI, G. U. O. **2010**. Sesquiterpenes from chinese red alga *Laurencia okamurai*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 8: 321–325.
- SIMS, J. J.; FENICAL, W.; WING, R. M.; RADLICK, P. **1971**. Marine natural products. I. Pacifenol, a rare sesquiterpene containing bromine and chlorine from the red alga, *Laurencia pacifica*. *Journal of the American Chemical Society*, 93: 3774–3775.
- SIMS, J. J.; LIN, G. H. Y.; WING, R. M. **1974**. Marine natural products X elatol, a halogenated sesquiterpene alcohol from the red alga. *Tetrahedron Letters*, 15 3487–3490.
- SMIT, A. J. **2004**. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*, 16: 245–262.
- SOARES, A. R.; ROBAINA, M. C. S.; MENDES, G. S.; SILVA, T. S. L.; GESTINARI, L. M. S.; PAMPLONA, O. S.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y.; KAISER, C. R.; ROMANOS, M. T. V. **2012**. Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against *Herpes simplex* virus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22: 714–723.
- STEIN, E. M.; ANDREGUETTI, D. X.; ROCHA, C. S.; FUJII, M. T.; BAPTISTA, M. S.; COLEPICOLO, P.; INDIG, G. L. **2011a**. Search for cytotoxic agents in multiple *Laurencia* Complex seaweed species (Ceramiales, Rhodophyta) harvested from the Atlantic Ocean with emphasis on the Brazilian state of Espírito Santo. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21: 239–243.
- STEIN, E. M.; COLEPICOLO, P.; AFONSO, F. A. K.; FUJII, M. T. **2011b**. Screening for antifungal activities of extracts of the Brazilian seaweed genus *Laurencia* (Ceramiales, Rhodophyta). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21 (2): 290–295.
- STENGEL, D. B.; CONNAN, S.; POPPER, Z. A. **2011**. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for commercial application. *Biotechnology Advances*, 29: 483–501.
- SUDATTI, D. B.; FUJII, M. T.; RODRIGUES, S. V.; TURRA, A.; DUARTE, H. M.; SOARES, A. R.; PEREIRA, R. C. **2016**. Diel variation of sesquiterpene elatol production: A chemical defense mechanism of the red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 64: 131–135.
- SUDATTI, D. B.; FUJII, M. T.; RODRIGUES, S. V.; TURRA, A.; PEREIRA, R. C. **2011**. Effects of abiotic factors on growth and chemical defenses in cultivated clones of *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales, Rhodophyta). *Marine Biology*, 158: 1439–1446.
- SUDATTI, D. B.; RODRIGUES, S. V.; PEREIRA, R. C. **2006**. Quantitative GC-ECD analysis of halogenated metabolites: Determination of surface and within-thallus elatol of *Laurencia obtusa*. *Journal of Chemical Ecology*, 32: 835–843.

- SUZUKI, M.; KUROSAWA, E. **1978**. Two New halogenated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia majuscula* Harvey. *Tetrahedron Letters*, 19: 4805–4808.
- SUZUKI, M.; KUROSAWA, E.; KURATA, K. **1987**. Majusculone, a novel norchamigrane-type metabolite from the red alga *Laurencia majuscula* Harvey. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 60: 3795–3796.
- SUZUKI, M.; SEGAWA, M.; SUZUKI, T.; KUROSAWA, E. **1983**. Structures of halogenated chamigrene derivatives, minor constituents from the red alga *Laurencia nipponica* Yamada. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 56: 3824–3826.
- SUZUKI, M.; TAKAHASHI, Y.; NAKANO, S.; ABE, T.; MASUDA, M.; OHNISHI, T.; NOYA, Y.; SEKI, K. **2009**. An experimental approach to study the biosynthesis of brominated metabolites by the red algal genus *Laurencia*. *Phytochemistry*, 70: 1410–1415.
- TAKAHASHI, Y.; SUZUKI, M.; ABE, T.; MASUDA, M. **1998**. Anhydroaplysiadiol from *Laurencia japonensis*. *Phytochemistry*, 48: 987–990.
- TOPCU, G.; AYDOGMUS, Z.; IMRE, S.; GÖREN, A. C.; PEZZUTO, J. M.; CLEMENT, J. A.; KINGSTON, D. G. **2003**. Brominated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*. *Journal of natural products*, 66: 1505–1508.
- UMEZAWA, T.; OGURI, Y.; MATSUURA, H.; YAMAZAKI, S.; SUZUKI, M.; YOSHIMURA, E.; FURUTA, T.; NOGATA, Y.; SERISAWA, Y.; MATSUYAMA-SERISAWA, K.; ABE, T.; MATSUDA, F.; SUZUKI, M.; OKINO, T. **2014**. Omaezallene from red alga *Laurencia* sp.: Structure elucidation, total synthesis, and antifouling activity. *Angewandte Chemie International Edition*, 53: 3909–3912.
- VAIRAPPAN, C. S. **2003**. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Biomolecular Engineering*, 20: 255–259.
- VAIRAPPAN, C. S.; ANANGDAN, S. P.; MATSUNAGA, S. **2009**. Diet-derived halogenated metabolite from the sea hare *Aplysia parvula*. *Malaysian Journal of Science*, 28: 269–273.
- VAIRAPPAN, C. S.; ANANGDAN, S. P.; TAN, K. L.; MATSUNAGA, S. **2010**. Role of secondary metabolites as defense chemicals against ice-ice Disease bacteria in biofouler at carrageenophyte rarms. *Journal of Applied Phycology*, 22: 305–311.
- VAIRAPPAN, C. S.; DAITOH, M.; SUZUKI, M.; ABE, T.; MASUDA, M. **2001a**. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. *Phytochemistry*, 58: 291–297.
- VAIRAPPAN, C. S.; KAMADA, T.; LEE, W.-W.; JEON, Y.-J. **2013**. Anti-inflammatory activity of halogenated secondary metabolites of *Laurencia snackeyi* (Weber-van Bosse) masuda in LPS-Stimulated RAW 264.7 macrophages. *Journal of Applied Phycology*, 25: 1805–1813.
- VAIRAPPAN, C. S.; SUZUKI, M.; ABE, T.; MASUDA, M. **2001b**. Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* Species. *Phytochemistry*, 58: 517–523.
- VEIGA-SANTOS, P.; PELIZZARO-ROCHA, K. J.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; SILVA, S. O.; SUDATTI, D. B.; BIANCO, E. M.; PEREIRA, R. C.; NAKAMURA, C. V. **2010**. *In Vitro* anti-trypanosomal activity of elatol isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Parasitology*, 137: 1661–1670.
- VERBRUGGEN, H.; COSTA, J. F. **2015**. The plastid genome of the red alga *Laurencia*. *Journal of phycology*, 51: 586–589.
- WANG, B.-G.; GLOER, J. B.; JI, N.-Y.; ZHAO, J.-C. **2013**. Halogenated organic molecules of Rhodomelaceae origin: Chemistry and Biology. *Chemical Reviews*, 113 (5): 3632–3685.

- WANKE, T.; PHILIPPUS, A. C.; ZATELLI, G. A.; VIEIRA, L. F. O.; LHULLIER, C.; FALKENBERG, M. **2015**. C15 acetogenins from the *Laurencia* Complex: 50 Years of research – an Overview. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 25: 569–587.
- WARASZKIEWICZ, S. M.; ERICKSON, K. L. **1974**. Halogenated sesquiterpenoids from the Hawaiian marine alga Nidificene and Nidifidiene. *Tetrahedron Letters*, 15: 2003–2006.
- WESSELS, M.; KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D. **2000**. New natural product isolation and comparison of the secondary metabolite content of three distinct samples of the sea hare *Aplysia dactylomela* from Tenerife. *Journal of Natural Products*, 63: 920–928.
- WHITE, D. E.; STEWART, I. C.; GRUBBS, R. H.; STOLTZ, B. M. **2008**. The catalytic asymmetric total synthesis of elatol. *Journal of the American Chemical Society*, 130: 810–811.
- WIJESINGHE, W. A. J. P.; KIM, E.-A.; KANG, M.-C.; LEE, W.-W.; LEE, H.-S.; VAIRAPPAN, C. S.; JEON, Y.-J. **2014**. Assessment of anti-inflammatory effect of 5 $\beta$ -Hydroxypalisadin B isolated from red seaweed *Laurencia snackeyi* in zebrafish embryo *in Vivo* model. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 37: 110–117.
- WINTER, J. M.; MOORE, B. S. **2009**. Exploring the chemistry and biology of vanadium-dependent haloperoxidases. *Journal of Biological Chemistry*, 284: 18577–18581.
- WRIGHT, A. D.; KÖNIG, G. M.; ANGERHOFER, C. K.; GREENIDGE, P.; LINDEN, A.; DESQUEYROUX-FAÚNDEZ, R. **1996**. Antimalarial activity: the search for marine-derived natural products with selective antimalarial activity. *Journal of Natural Products*, 59: 710–716.
- YU, X.-Q.; HE, W.-F.; LIU, D.-Q.; FENG, M.-T.; FANG, Y.; WANG, B.; FENG, L.-H.; GUO, Y.-W.; MAO, S.C. **2014**. A seco-laurane sesquiterpene and related laurane derivatives from the red alga *Laurencia Okamurae* Yamada. *Phytochemistry*, 103: 162–170.
- YU, X.-Q.; JIANG, C.-S.; ZHANG, Y.; SUN, P.; KURTÁN, T.; MÁNDI, A.; LI, X.-L.; YAO, L.-G.; LIU, A.-H.; WANG, B.; GUO, Y.-W.; MAO, S.-C. **2017**. Compositacins A–K: Bioactive chamigrane-type halosesquiterpenoids from the red alga *Laurencia composita* Yamada. *Phytochemistry*, 81–93.
- ZALETA-PINET, D. A.; HOLLAND, I. P.; MUÑOZ-OCHOA, M.; MURILLO-ALVAREZ, J. I.; SAKOFF, J. A.; VAN ALTENA, I. A.; MCCLUSKEY, A. **2014**. Cytotoxic compounds from *Laurencia pacifica*. *Organic and medicinal chemistry letters*, 4: 8.



## CAPÍTULO III

---

**Detection of a chemical cue from the host seaweed *Laurencia dendroidea* by the associated mollusc *Aplysia brasiliiana***

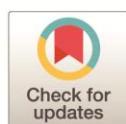
## RESEARCH ARTICLE

# Detection of a chemical cue from the host seaweed *Laurencia dendroidea* by the associated mollusc *Aplysia brasiliiana*

N. Nocchi<sup>1,2</sup>, A. R. Soares<sup>2\*</sup>, M. L. Souto<sup>3</sup>, J. J. Fernández<sup>3</sup>, M. N. Martin<sup>3</sup>, R. C. Pereira<sup>1#\*</sup>

**1** Programa de Pós-graduação em Dinâmica do Oceano e da Terra, Universidade Federal Fluminense, Campus da Praia Vermelha, Niterói, Brazil, **2** Grupo de Produtos Naturais de Organismos Aquáticos (GPNOA), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Núcleo em Ecologia e Desenvolvimento Sócio-Ambiental de Macaé, Macaé, Brazil, **3** Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González" (IUBO), Centro de Investigaciones Biomédicas de Canarias (CIBICAN), Departamento de Química Orgánica, Universidad de La Laguna (ULL), La Laguna, Tenerife, España

\* Current address: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil  
 \* angelica.r.soares@gmail.com (ARS); rcrespo@id.uff.br (RCP)



## OPEN ACCESS

**Citation:** Nocchi N, Soares AR, Souto ML, Fernández JJ, Martin MN, Pereira RC (2017) Detection of a chemical cue from the host seaweed *Laurencia dendroidea* by the associated mollusc *Aplysia brasiliiana*. PLoS ONE 12(11): e0187126. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187126>

**Editor:** Riccardo Mozzachiodi, Texas A&M University Corpus Christi, UNITED STATES

**Received:** July 7, 2017

**Accepted:** October 13, 2017

**Published:** November 2, 2017

**Copyright:** © 2017 Nocchi et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** Financial Support was provided by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro and the Project of the Spain National Plan (CTQ2014-55888-C03-01). RCP thanks CNPq for Research Productivity fellowships. NN thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

## Abstract

Chemical cues from sessile hosts can attract mobile and associated organisms and they are also important to maintain associations and overall biodiversity, but the identity and molecular structures of these chemicals have been little explored in the marine environment. Secondary metabolites are recognized as possible chemical mediators in the association between species of *Laurencia* and *Aplysia*, but the identity of the compounds has not been established. Here, for the first time, we experimentally verify that the sesquiterpene (+)-elatol, a compound produced by the red seaweed *Laurencia dendroidea*, is a chemical cue attracting the associated sea hare *Aplysia brasiliiana*. In addition to revealing the nature of the chemical mediation between these two species, we provide evidence of a chemical cue that allows young individuals of *A. brasiliiana* to live in association with *L. dendroidea*. This study highlights the importance of chemical cues in *Laurencia-Aplysia* association.

## Introduction

In the marine environment, chemical cues or waterborne infochemicals act as mediators in different intra- and inter-specific ecological interactions between organisms [1], such as chemical defense [2], settlement and recruitment of larvae [3], feeding stimuli [4], foraging behavior [5], selection and localization of prey [6], among others. Marine organisms produce a wide variety of molecules that mediate these ecological interactions [1, 7]. Despite their broad and crucial roles in population structure, community organization and ecosystem function in marine systems, the omnipresence of these chemical cues and their impacts are still inadequately recognized [1]. However, scientific efforts have been increasing to elucidate the mechanisms of chemical communication between organisms in marine environments [8].

Red seaweeds of the genus *Laurencia* are well established as rich producers of secondary metabolites [9]. Since investigations of this taxon began more than 60 years ago, more than

(CAPES) for a doctoral fellowship and CNPq for a sandwich doctoral fellowship.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

1,000 secondary metabolites such as terpenes and C<sub>15</sub> acetogenins (both halogenated or not) have been isolated from about 60 species [10]. These metabolites not only possess unique structural features, but they also exhibit significant ecological roles as antifoulants [11] and as a defense against herbivores [12]. Despite the strong defensive properties of these chemicals, *Aplysia* sea hares selectively graze on *Laurencia* species and have the ability to sequester and store secondary metabolites from these red seaweeds in a specialized digestive gland [13,14]. A huge number of molecules have been discovered from *Aplysia* species [15] and these sea hares possess secondary metabolites obtained either from their algal diets or by *de novo* direct synthesis [16], with the former being slightly modified. This feeding relationship makes *Aplysia* species promoters of chemical diversity, since most of the metabolites found in these molluscs are structurally similar, but distinct from those produced by *Laurencia* species [17].

The maintenance of the relationship between *Laurencia* and *Aplysia* species is probably due to the adaptive evolution of these herbivores to metabolism of the seaweed chemicals giving them the ability to use as a self-defense mechanism [18,19]. In addition, some photosynthetic proteins from *Laurencia* are converted to an effective chemical defense mechanism displayed by *Aplysia*, which releases them as a purple ink and opaline when attacked by predators [20]. In fact, these secretions contain vital metabolites for *Aplysia* species, which can act as feeding stimulants, feeding deterrents, and aversive chemicals [21].

In general, host seaweeds are preferred sites for metamorphosis of larvae in most species of sea hares [22]. For *Aplysia* species we observed that these organisms preferentially inhabit and grow better on red seaweeds, including *Laurencia* species [13,14]. Evidence has shown that chemical mediation is vital in interactions between species of *Laurencia* and *Aplysia* [17], but the nature of the compounds involved in this interaction has not been established [7]. Although *Aplysia* and *Laurencia* are rich sources of secondary metabolites, these compounds have been mainly studied in the context of bioprospecting for bioactive molecules [17,23].

Due to the close and chemically-mediated relationship between *Laurencia* algae and *Aplysia* sea hares, we hypothesized that secondary metabolites produced by *Laurencia dendroidea* can act as important chemical cues for the specialist predator *Aplysia brasiliiana*. In this work, we addressed the following two questions, evaluated under laboratory conditions: (1) Which compounds in seawater are exudates from *L. dendroidea*? and (2) How does the mollusc *A. brasiliiana* respond to *L. dendroidea* metabolites in bioassays? Although many studies assume its occurrence, to our knowledge this is the first study that tested and identified *Laurencia* chemical cues for *Aplysia*.

## Materials and methods

### Collection of organisms

Specimens of *Laurencia dendroidea* and young individuals (4.8 ± 1.5 SD cm in length; N = 194) of the sea hare *Aplysia brasiliiana* found living in association with these algae were collected from the intertidal zone of Azeda Beach (Búzios, 22°44'33.6" S, 41°52'55.6" W, Rio de Janeiro State, Brazil) by free diving in September, 2014. After collection, all the organisms were transported to the laboratory in individual aquaria containing seawater with aeration and maintained under constant temperature (22°C), aeration, salinity (35), and a 12 h:12 h light:dark photoperiod. During the acclimatization period of 48 hours, the specimens of *A. brasiliiana* were fed with fresh palatable green seaweed *Ulva* sp. before starting the assays.

Collection of organisms was supported by authorization SISBIO 34321–1 (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade).

### *Laurencia*-conditioned seawater (LCW) and *Laurencia*-exuded metabolites in seawater extract (SEM)

For the laboratory detection of the *L. dendroidea* exuded metabolites in seawater, a proportion of 24 g of algae mass to 1 L of artificial seawater ("Sea salts" SIGMA, USA, in distilled water) was used for incubation in fifteen Erlenmeyer flasks of 3 liters each. They were kept for 12 hours in a BOD chamber at 20°C, under constant illumination and constant aeration. Then, the algae were taken out from the flasks and the conditioned water was passed through a 0.45 µm filter Millipore system to yield the *Laurencia*-conditioned seawater (LCW). Part of this LCW was used immediately in Y-maze tests (20 L), and the remaining LCW (10 L) was used to identify the metabolites exuded by *L. dendroidea*. Artificial seawater (without the presence of *L. dendroidea*) was used as a control for chemical analyses and as a control stimulus in the Y-maze tests. The portion of the LCW separated for chemical analysis was passed through a glass column filled with DIAON HP20 resin (Sigma-Aldrich). Then the resin was washed with ultrapure water to eliminate salts and the metabolites retained in the resin were eluted with 600 mL of methanol (Tedia, HPLC), that was evaporated to yield the *Laurencia*-exuded metabolites in seawater extract (SEM). The same procedure was used to produce a representative control from artificial seawater. Both the SEM and the control extract from artificial seawater were analyzed by GC/MS.

### Chemical extraction and identification of secondary metabolites

Whole fresh tissues of *L. dendroidea* (450 g) were extracted in EtOAc/MeOH (1:1 v/v). The resulting extract was filtered and the solvent was eliminated in a rotary evaporator under reduced pressure. The extract (1.4 g) was submitted to size exclusion chromatography using Sephadex LH-20 (6 x 34 cm, Pharmacia Fine Chemicals®) and eluted with *n*-hexane/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (2:1:1). Seven fractions (FR<sub>A</sub> to FR<sub>G</sub>) were obtained and analyzed by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) of <sup>1</sup>H. From the <sup>1</sup>H NMR analysis the fraction-enriched with sesquiterpenes (283 mg, FR<sub>D</sub>) was subsequently processed by chromatography in medium-pressure Lobar LiChroprep Si-60 (40–63 µm, MERCK®) using *n*-hexane/EtOAc (9:1) at 2 mL min<sup>-1</sup>. Twelve fractions (FR<sub>1</sub> to FR<sub>12</sub>) were obtained, which allowed isolation of compounds **1** (1.45 mg, FR<sub>4</sub>) and **2** (120.49 mg, FR<sub>5</sub>). Fractions FR<sub>7</sub> and FR<sub>8</sub> were purified using high-performance liquid chromatography (HPLC) with a µ-Porasil™ silica column (125 Å; 1.9 x 15 cm) and eluted with *n*-hexane/EtOAc (9:1), which yielded compounds **3** (0.52 mg) and **4** (1.51 mg) from fraction FR<sub>8</sub> and compound **5** (2.7 mg) from fraction FR<sub>7</sub>.

The chemical structures of the isolated compounds were established by NMR of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C, correlation spectroscopy (COSY), heteronuclear multiple-bond correlation (HMBC) and heteronuclear single quantum correlation (HSQC) in a Bruker® Avance 600 MHz system using CDCl<sub>3</sub>. Chemical shifts were reported in ppm referenced to solvent signals (CDCl<sub>3</sub>: δ<sub>H</sub> 7.26, δ<sub>C</sub> 77.16). Mass spectrometric data were acquired using a VG-Autospec Fisons system in electrospray ionization mode. The specific rotations [α]<sub>D</sub> were determined using a Polarimeter Perkin-Elmer® (model 241), under conditions of 20°C, sodium D line λ = 589 nm and cell path length 1 dm. All data were compared with the available literature [24–29].

**10-bromo-9-hydroxy-chamigra-2,7(14)-diene (1):** oil; [α]<sub>D</sub> -125 (c 0.008, CHCl<sub>3</sub>), lit. [α]<sub>D</sub> -110 (c 0.20, CHCl<sub>3</sub>) [24]; ESI-HRMS (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>23</sub><sup>79</sup>BrONa, 321.0830 and C<sub>15</sub>H<sub>23</sub><sup>81</sup>BrONa, 323.0810; found 321.0834 and 323.0807 (ratio 100:97), respectively. All other physical and spectroscopic data are in agreement with those previously reported [24].

**(+)-elatol (2):** oil; [α]<sub>D</sub> +79 (c 0.06, CHCl<sub>3</sub>), lit. [α]<sub>D</sub> +75 (c 1.01, CHCl<sub>3</sub>) [24,25]; ESI-HRMS (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sup>35</sup>Cl<sup>79</sup>BrNa, 355.0440 and C<sub>15</sub>H<sub>22</sub>O<sup>35</sup>Cl<sup>81</sup>BrNa, 357.0420;

found 355.0443 and 357.0435 (ratio 100:94), respectively. All other physical and spectral properties are in agreement with published data [25,26].

(Z)-10,15-dibromo-9-hydroxychamigra-1,3(15),7(14)-triene (**3**): colorless oil;  $[\alpha]_D +10$  (*c* 0.02,  $\text{CHCl}_3$ ), lit.  $[\alpha]_D +3$  (*c* 0.002,  $\text{CHCl}_3$ ) [26]; ESI-HRMS (*m/z*):  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  calcd. for  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}^{79}\text{Br}_2\text{Na}$ , 396.9779;  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}^{79}\text{Br}^{81}\text{Br}\text{Na}$ , 398.9758 and  $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}^{81}\text{Br}_2\text{Na}$ , 400.9738; found 396.9779, 398.9756, and 400.9749 (ratio 48:100:52), respectively. All other physical and spectroscopic data are comparable to those previously reported [27].

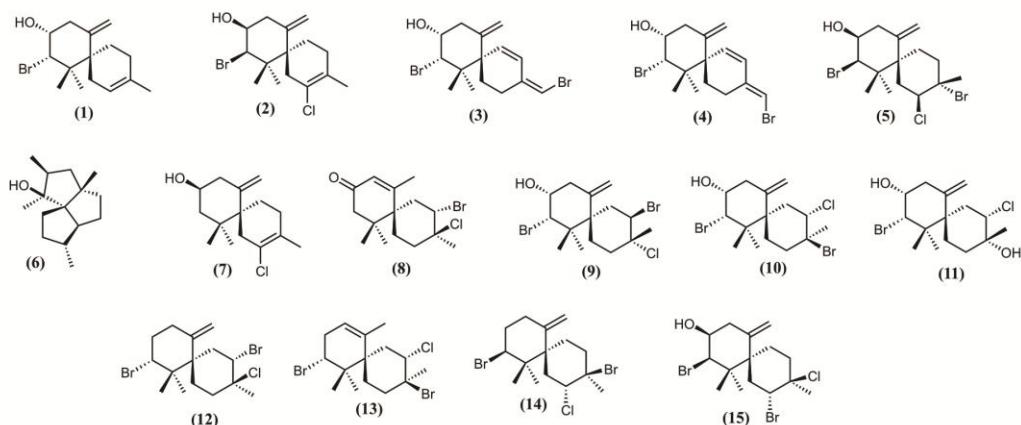
(E)-10,15-dibromo-9-hydroxychamigra-1,3(15),7(14)-triene (**4**): colorless oil;  $[\alpha]_D -31$  (*c* 0.016, CHCl<sub>3</sub>), lit.  $[\alpha]_D -40$  (*c* 0.01, CHCl<sub>3</sub>) [26]; ESI-HRMS (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sup>79</sup>Br<sub>2</sub>Na, 396.9779, C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sup>79</sup>Br<sup>81</sup>Na, 398.9758 and C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>O<sup>81</sup>Br<sub>2</sub>Na, 400.9738; found 396.9784, 398.9761, and 400.9756 (ratio 48:100:52), respectively. All other physical and spectroscopic data are in agreement with those previously reported [27].

*isoobtusol* (**5**): white crystal;  $[\alpha]_D +77$  (*c* 0.03, CHCl<sub>3</sub>), lit.  $[\alpha]_D +25$  (*c* 0.50, CHCl<sub>3</sub>) [27–28]; ESI-<sup>1</sup>H-NMR (*m/z*): [M+Na]<sup>+</sup> calcd. for C<sub>15</sub>H<sub>23</sub><sup>79</sup>Br<sub>2</sub><sup>81</sup>Br<sup>35</sup>ClONa, 436.9681, C<sub>15</sub>H<sub>23</sub><sup>79</sup>Br<sub>2</sub><sup>35</sup>ClONa, 436.9672 and C<sub>15</sub>H<sub>23</sub><sup>81</sup>Br<sub>2</sub><sup>35</sup>ClONa, 438.9661; 434.9732, 436.9694, and 438.9674 (ratio 48:100:73), respectively. All other physical and spectroscopic data are in agreement with those previously reported [27–29].

#### GC/MS analysis

Chemical profiles were obtained on a GC/MS Agilent 7890B, MS7000C (using an automatic injector CombiPAL with the control software MassHunter) in the electron impact mode (70 eV). Chromatographic separation was achieved with a HP-5MS UL capillary column (15 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m). Helium was used as the carrier gas (flow rate of 1 mL min<sup>-1</sup>). The oven temperature was 60°C for the first 2.5 min, then increased at a rate of 10°C·min<sup>-1</sup> to 280°C and held at the latter temperature for 6 min, with a total run time of 30.5 min. Injector and ion source temperatures were 300 and 240°C. Samples were injected in splitless mode. The detection was performed in the full scan mode, using a mass range of 60–400 *m/z*. All samples were solubilized in dichloromethane and filtered through a PTFE Syringe filter (pore width of 0.45  $\mu$ m; diameter of 13 mm) before the injections.

The chemical profiles of all the extracts (whole algal extract, SEM and control) were obtained by GC/MS. The isolated compounds (**1–5**) and purified standards (**6–15**) (Fig 1)



**Fig 1.** Chemical structures of the metabolites found in *L. dendroidea*.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187126.g001>

available in our laboratory were also analyzed by GC/MS to construct a *L. dendroidea* metabolites database. Compounds **6–15** were obtained as described by the literature [30–33]. Identification of metabolites exuded into seawater by *L. dendroidea* (SEM) was performed by comparing the peaks of the SEM chromatogram with its respective control (artificial seawater extract). A baseline alignment of each chromatogram was performed prior to comparison and the time-shift among peaks was corrected by the Correlation Warping Algorithm (COW), as described by Nielsen and collaborators (1998) [34], using the software COW (<http://www2.biocentrum.dtu.dk/mycology/analysis/cow>). Compounds present in the algal extract, and SEM extract were identified based on their mass spectra data, retention time, and comparison with pure compounds available in our laboratory.

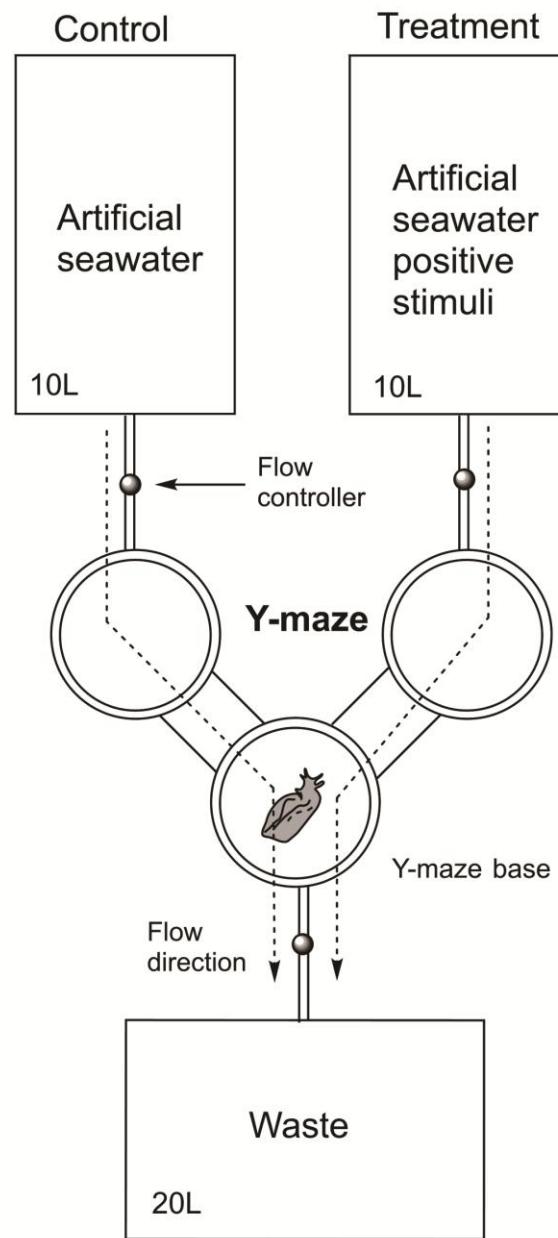
The compound identified from the SEM extract (elatol) was quantified using external standardization by means of an analytical curve calculated from four different concentrations of purified elatol in dichloromethane (10 to  $10^{-2}$   $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Detection and quantification limits were determined according to United States Environmental Protection Agency provisions; we obtained an analytical curve in a concentration range almost 5 times the noise of the baseline. Then, the concentrations of three replicates of the standard were determined from this curve, and its standard deviation was calculated. The relative standard deviation (RSD) or coefficient of variation (CV) was 10%.

### Y-maze experiments

Y-maze behavioural bioassays were performed to determine whether the specimens of *A. brasiliiana* would be attracted by *L. dendroidea* compounds. The maze used in this study consisted of a Y-shaped plastic tube connected to two 10 L aquariums, with seawater flowing by gravity from the aquariums through each branch of the Y-maze (Fig 2). One of the aquariums contained artificial seawater with the tested stimuli (treatment), while the other was filled with pure artificial seawater, i.e. the control (see below). Water flowed from the two aquariums (treatment and control) through the Y-maze and exited at the base of the conjoined branch. Soluble coloring was used to verify the water plume and flow regulators were used to standardize the flux in the control and treatment aquaria before each experiment. The artificial seawater was used at 26°C and a salinity of 35.

In the intervals between each assay, the entire Y-maze was washed with distilled water and rinsed with seawater and control and stimulus arms of the Y-maze were switched. The seawater flow in each branch of the Y-maze was controlled by flow controllers. Individuals of *A. brasiliiana* were initially positioned at the base of the Y-maze at the start of each bioassay.

Six experiments were undertaken with individual *A. brasiliiana* choosing between stimulus vs artificial seawater. Each experiment consisted to introduce one sea hare at the base of the Y-maze and its behavior in terms of choosing between the arms containing either the stimulus or the artificial seawater was observed for up to 15 min. Three responses were considered: (a) positive, when *A. brasiliiana* swam to the end of the stimulus arm; (b) negative, when *A. brasiliiana* swam to the end of the control arm; and (c) no response, when *A. brasiliiana* did not choose either one of the arms within the 15 min time frame. The stimulus tested in each experiment was drive in the follow sequence: 1) Control stimulus ( $n = 21$ ): both arms of the Y-maze tube were filled only with artificial seawater in order to verify the ability of *A. brasiliiana* individuals to overcome the water flow in the branches of the Y-maze structure; 2) Fresh *L. dendroidea* ( $n = 32$ ): one specimen of this seaweed was placed in the stimulus arm of the Y-maze, while a plastic *L. dendroidea* mimic with equivalent size and volume of this fresh seaweed was placed in the artificial seawater arm (control) to maintain an equivalent flow of water through the tube during the experiment; 3) *Laurencia*-conditioned seawater (LCW): the stimulus aquarium



**Fig 2. The maze used in this study.** The control was in the left aquarium flowing pure seawater and the treatment was in the right aquarium flowing seawater plus a stimuli (e.g. *Laurencia tallus* or *Laurencia*-exuded metabolites in seawater extract (SEM).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187126.g002>

was filled with LCW while only artificial seawater was used in the control tank. A total of 43 replicates were used; 4) *L. dendroidea* extract: the effect of compounds obtained from fresh *L. dendroidea* on *A. brasiliiana* was evaluated using the extract at its obtained concentration (the amount of extract per algae dry mass, 146 mg g<sup>-1</sup>). A piece of filter paper was cut into squares 1.5 × 1.5 cm and each square was equivalently soaked into the extract previously dissolved in dichloromethane (concentration of extract determined as the extract equivalent to the dry weight of alga = dry weight of filter paper). For the control, an equivalent square piece of paper was soaked in dichloromethane without the extract. After evaporating the solvent, each piece of paper of control and treatment was positioned at its respective Y-maze arm. A total of 42 replicates was used; 5) *Laurencia*-exuded metabolites in seawater extract (SEM): To evaluate the effect of SEM extract (using the obtained concentration of extract per algal dry mass incubated, 5 mg g<sup>-1</sup>) on the *Aplysia* specimens, the experiments were conducted in the same way as described for LCW above. A total of 30 replicates was used; and 6) Elatol-conditioned water (ECW): the effect of elatol (2), the compound identified in the SEM by GC/MS, on *Aplysia* specimens was investigated. The amount of treatment added was such that the final concentration was equal to the natural isolated concentration based on seawater volume used for extraction (0.02 mg L<sup>-1</sup>). The compound was solubilized in 35 μL DMSO and added to the artificial seawater in the stimulus arm. The same amount of 35 μL DMSO was added to the artificial seawater in the control arm. A total of 26 replicates were used in this experiment. In the intervals between each assay, the entire Y-maze was washed and the control and stimulus arms of the Y-maze were switched in order to remove any remaining *A. brasiliiana* scents or previous chemical cues. For each assay a new *A. brasiliiana* specimen was used. In the end of the experiments all the animals were returned to field.

The significance of *A. brasiliiana* behavioral choice was evaluated by a chi-squared test that compared the number of times that *A. brasiliiana* moved to for the three response groups (positive response, negative response and no response) against an equal random distribution. Differences between the groups were deemed statistically significant when p ≤ 0.05.

## Results

### GC/MS database of metabolites of *Laurencia dendroidea*

A total of 15 sesquiterpenes of *L. dendroidea* were analysed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) in order to obtain a GC/MS database of *Laurencia* metabolites (supp 1). Extract of *L. dendroidea* yielded compounds 1–5, which were purified using a series of chromatographic steps over Sephadex LH-20, silica gel and normal-phase high performance liquid chromatography (HPLC). The compounds were elucidated based on spectral data: optical rotation, infrared, electron ionization (EIMS) and/or high-resolution electron-impact mass spectroscopy (HREIMS), 1D and 2D NMR. The known halogenated chamigrane sesquiterpenes were identified by comparing their spectroscopic data with the literature as follows: 10-bromo-9-hydroxy-chamigra-2,7(14)-diene (1) [24], (+)-elatol (2) [25], (Z)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (3) [27], (E)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (4) [27] and isoobtusol (5) [28] (The NMR data and all the MS and NMR spectra of 1–5 are available in the supplemental material). Another 10 metabolites that were isolated previously by our research group [30–33] were used here to further populate the GC/MS *Laurencia* metabolite database: triquinane (6) [31,33]; debromoelatol (7) [30,31]; enone of desbromocartilagineol or laurencenone D (8) [35]; cartilagineol (9) [30,31]; obtusol (10) [31–32]; dendroidiol (11) [30,31]; nidificene (12) [31]; 3,10-dibromo-4-chloro-alpha-chamigrane (13) [31]; (+)-obtusane (14) [30] and rogiolol (15) [31].

**Table 1.** Retention time ( $r_t$ ); main ions ( $m/z$ ) observed in the mass spectra (EIMS) and detection of sesquiterpenes in the *L. dendroidea* extract and *Laurencia*-exuded metabolites in seawater extract (SEM), as characterized by GC/MS analysis. The presence of identified compounds in the samples was marked (x).

$r_t$ (min)	<i>L. dendroidea</i> compounds database	$m/z$	<i>L. dendroidea</i> extract	SEM
14.48	triquinane (6)	222; 204; 135	x	
18.71	debromoelatol (7)	236; 221; 208	x	
19.38	cartilagineol (9)	317; 299; 235		
19.74	10-bromo-9-hydroxy-chamigra-2,7(14)-diene (1)	283; 201; 269	x	
21.57	isoobtusol (5)	317; 299; 235	x	
21.76	(+)-elatol (2)	299; 253; 199	x	x
22.25	enone of desbromocartilagineol or laurencenone D (8)	278; 199; 161	x	
22.49	dendriol (11)	332; 299; 235		
23.09	nidificene (12)	396; 316; 237		
23.09	3,10-dibromo-4-chloro-alpha-chamigrane (13)	396; 316; 237		
23.15	(+)-obtusane (14)	396; 316; 237		
23.38	(Z)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (3)	296; 240; 279	x	
23.55	(E)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (4)	296; 240; 279	x	
24.48	rogiolol (15)	317; 299; 235		
24.55	obtusol (10)	317; 299; 235		

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187126.t001>

### Identification of metabolites in extracts of *Laurencia dendroidea* by GC/MS analysis

The *L. dendroidea* extract, *Laurencia*-exuded metabolites in seawater extract (SEM) and control extract (extract from artificial seawater) were analyzed by GC/MS. The retention times and mass spectroscopy patterns of the compounds in these extracts were compared to the *L. dendroidea* metabolites database (Table 1 and Fig 3). Compounds 1–8 were detected in the *L. dendroidea* extract (Fig 3A), whereas only compound 2 (elatol) was found in the exudate (SEM) (Fig 3B) at a concentration of 0.02 mg L<sup>-1</sup> (or 0.0007 mg g<sup>-1</sup> by algal wet weight;  $y = 1E + 10x - 3E + 08$ ;  $R^2 = 0.99$ ). No metabolites were identified in the control extract (Fig 3C).

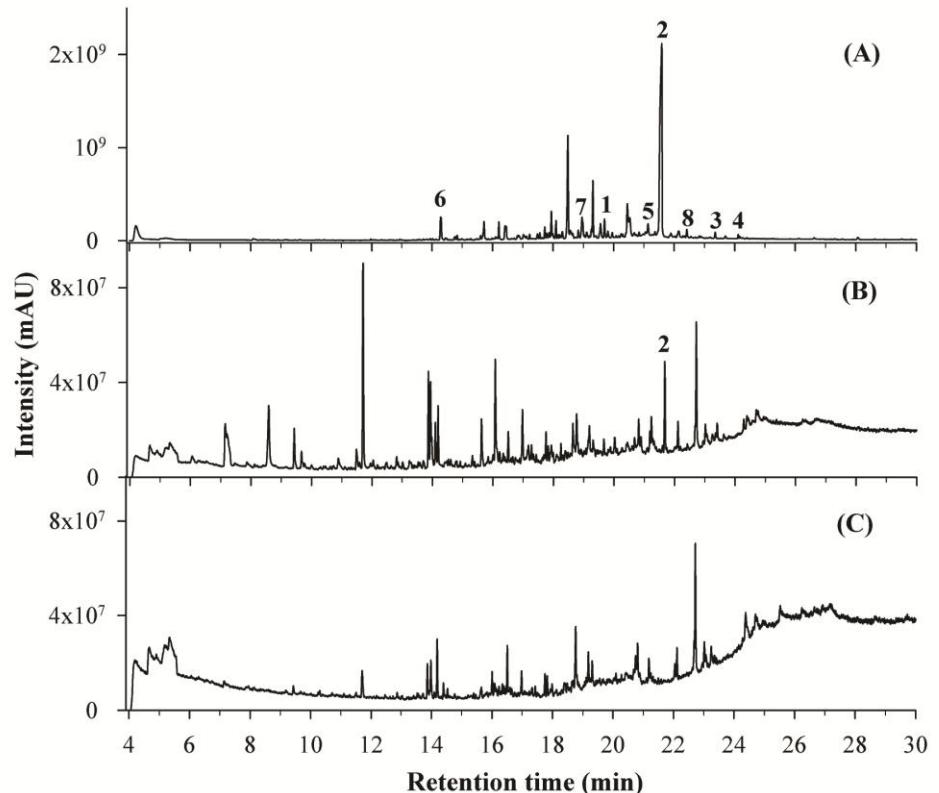
### Y-maze bioassays

Fig 4 shows that a significantly higher percentage of individuals of *A. brasiliiana* (according to Chi-square tests) selected the arm of the Y-maze containing one type of chemical cue (Fig 4), represented by the presence of fresh *L. dendroidea* ( $p < 0.005$ ;  $\chi^2 = 25.187$ ; DF = 2), LCW ( $p < 0.005$ ;  $\chi^2 = 16.791$ ; DF = 2), *L. dendroidea* extract ( $p < 0.005$ ;  $\chi^2 = 18.143$ ; DF = 2), SEM ( $p < 0.05$ ;  $\chi^2 = 15.20$ ; DF = 2), or elatol-conditioned water ( $p < 0.005$ ;  $\chi^2 = 7.00$ ; DF = 2). These results are reinforced by the absence of preferential displacement (no response) of 86% of the 21 individuals of *A. brasiliiana* in our control tests ( $p < 0.005$ ;  $\chi^2 = 26.00$ ; DF = 2).

### Discussion

Our results showed that the mollusc *Aplysia brasiliiana* is able to detect and respond to chemicals produced and exuded by *Laurencia dendroidea*. This mollusc showed a positive chemotaxis by the presence of live seaweed, its water exudates in conditioned water (LCW) and also to its lipophilic extract (SEM).

Benthic marine invertebrates sense molecules from other organisms and use these compounds in different ecological contexts as communication, navigation and foraging behaviour [36]. These organisms produce and detect a wide range of polar and nonpolar compounds, but



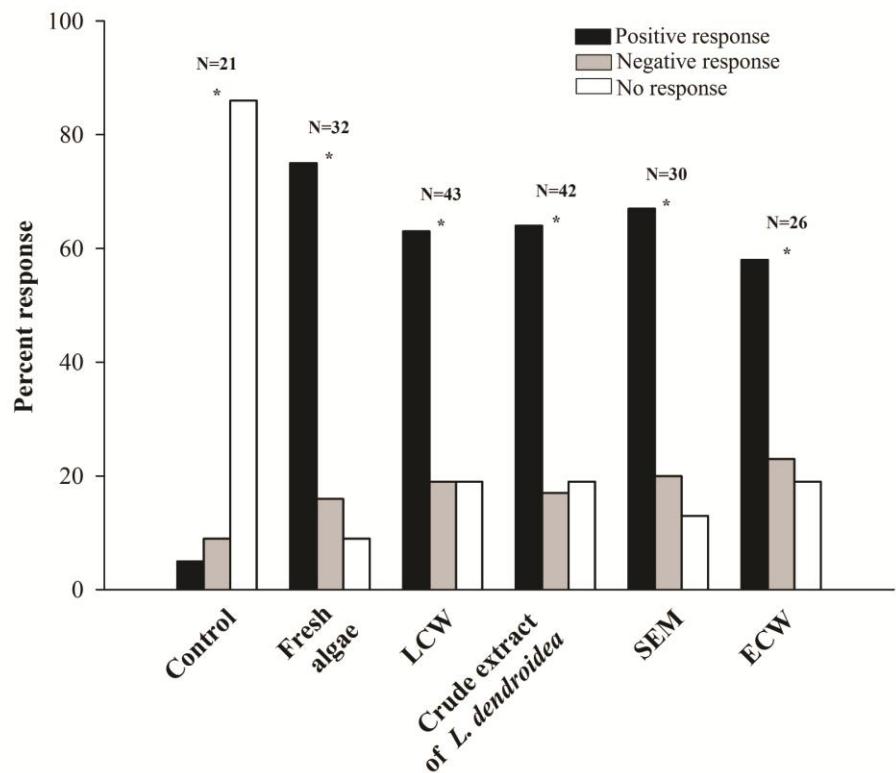
**Fig 3.** GC/MS chromatograms. **(A)** *L. dendroidea* extract. **(B)** *Laurencia*-exuded metabolites in seawater extract (SEM). **(C)** Control extract (from artificial seawater). Compounds identified using the GC/MS *Laurencia* metabolite database: 10-bromo-9-hydroxy-chamigra-2,7(14)-diene (**1**), (+)-elatol (**2**), (*Z*)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (**3**), (*E*)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (**4**), isoobtusol (**5**), triquinane (**6**), debromoelatol (**7**) and enone of desbromocartilagineol or laurencenone D (**8**).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187126.g003>

their identities are poorly understood [7]. Here, the lipophilic compounds exuded by *L. dendroidea* into seawater were detected by GC/MS analysis. Among them, the halogenated sesquiterpene (+)-elatol (**2**) was identified and revealed as one of the major compounds. In addition, the analysis of *L. dendroidea* extract revealed (+)-elatol as the major compound produced. These results indicated that (+)-elatol was exuded by alga into seawater.

The nonpolar (+)-elatol (**2**) is a known terpenoid isolated from *Laurencia* species that has multiple ecological functions, including anti-herbivory [12] and antifouling activities [37]. In our work, (+)-elatol attracted *A. brasiliiana* in Y-maze experiments indicating its potential as a chemical mediator in the interaction between *Laurencia* and *Aplysia*, its associated fauna.

Liposoluble terpenoids can mediate different alga-herbivore interactions. Halimedatetraacetate is a sesquiterpenoid produced by the green alga *Halimeda incrassata* identified as a foraging cue for the specialist gastropod *Elysia tuca* [38]. As one of the few herbivores that preferentially consume *Halimeda* species, *Elysia* may locate its prey by tracking *Halimeda*-derived chemical cues. This herbivore is frequently found associated to *H. incrassata*, which is able to sequester its chemical defenses to become unpalatable to its predators [39].



**Fig 4. Percent responses of *A. brasiliiana* specimens to different treatments in Y-maze bioassays.** Control = artificial seawater without the presence of any *L. dendroidea* stimuli; LCW = *L. dendroidea* conditioned water; SEM = *Laurencia*-exuded metabolites in seawater extract; and ECW = elatol-conditioned water. Asterisks (\*) denote significant differences between the response groups according to Chi-square tests ( $p \leq 0.05$ ).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187126.g004>

The oligophagous herbivorous molluscs belonging to the genus *Aplysia* feed primarily on red seaweeds and as well as the mentioned gastropod *Elysia tuca*, they are able to accumulate algal metabolites from these diets, which have been hypothesized to function as a defense against predators [13,16,18]. In fact, some of the halogenated sesquiterpenes isolated from *L. dendroidea*, such as the enantiomer of 10-bromo-9-hydroxy-chamigra-2,7(14)-diene (1), (+)-elatol (2), (Z)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (3), (E)-10,15-dibromo-9-hydroxy-charmigra-1,3(15),7(14)-triene (4), isoobtusol (5), cartilagineol (9), obtusol (10) and rogiolol (15) have also been found in *Aplysia* species [16,18,26, 30, 40–43]. These findings reinforce the importance of these chemicals in the close relationship maintained between *Laurencia* and the sea hares belonging to the genus *Aplysia*.

Chemoreception can be the principal sensory system driving behavior for several marine organisms, including slowmoving molluscs belonging to the genus *Aplysia* [36]. Specific receptors involved in chemical signaling are able to detect and to bind to different compounds as water-soluble amino acids, organic acids or liposoluble terpenoids [44]. The sea hare *Aplysia californica*, for example, has a well-developed chemical sense with rhinophores and tentacles that help it to localize odors of its main food, i.e., seaweeds belonging to *Plocamium* and

*Laurencia* genus [45]. *A. brasiliiana*, which usually swims in order to find food [46], probably use similar sensors for localization. Our results provide evidence that secondary metabolites are important chemical cues mediating the interaction between *A. brasiliiana* and *L. dendroidea*.

Identification of chemical communication and discrimination between evolved functions (signals) and unintentional releases (cues) are significant challenges in aquatic biology [8]. Chemical signals are intentionally released by the sender to convey information about presence of the signaler or the signaler's environment changing the behavior of the receiver; this change of behavior must be profitable to sender and receiver. In general, signals must be honest and reliable. Already chemical cues are compounds unintentionally released by the sender that any other organism can use as a guide to display a particular behavior, benefiting the receiver exclusively [47] Distinguishing these two modes of information is essential in identifying, properly, a chemical substance that triggers a certain behavior in another individual, and only a closer look at the chemical compounds involved brings clarification about its ecological and evolutionary interactions [48]. Here, for the first time, the combination of experiments allowed to verify that the sea hare *A. brasiliiana* is attracted by the sesquiterpene (+)-elatol as a chemical cue at different concentrations. In the experiments using conditioned water and pure elatol, the concentration of this compound was probably higher than that in natural conditions. On the other hand, in experiments using a unique piece of algal thallus, the exudated concentrations are expected to be similar to natural conditions, and the result obtained in this assay was similar that verified using conditioned water and pure elatol. In all cases, elatol present in the water was sufficient to attract *A. brasiliiana*.

Additionally, the diurnal production of elatol by *L. dendroidea* is dynamic and strongly correlated to the primary photosynthetic metabolism [49]. So, it is expected that its surface concentration is variable creating different scenarios for the chemical sinalization and interactions between the host seaweed and its associated fauna including the mollusc *A. brasiliiana*.

Several species of *Laurencia* contain refractile membrane-bound vesicles (*corps en cerise*) in the outer cells or cortical layer, which act as locations for the biosynthesis and storage of halogenated secondary metabolites [50], including elatol. Through a transport system, these metabolites reach the surface and provide essential cues as surface-mediated chemicals [51]. A previous study revealed that elatol occurs in very low amounts on the surface of *L. dendroidea* ( $0.006 \text{ mg g}^{-1}$ ) when compared to the highest within-thallus quantities ( $9.89 \text{ mg g}^{-1}$ ) based on algal dry weight [52]. Low concentrations of elatol on the surface of *L. dendroidea* did not inhibit herbivory by sea urchins, settlement of barnacle larvae, or mussel attachment [51], but is probably enough to attract *A. brasiliiana*.

Compared to adults, juvenile sea hares are known to be subject to high predation pressure [53]. In addition, juvenile sea hares have restricted diets, often eating only one or a few types of red seaweeds [54]. Several small sedentary herbivores (mesograzers such as amphipods, crabs and polychaetes) can significantly decrease their susceptibility to predation by living among and feeding on seaweeds that are avoided by predators [55]. In our bioassays, we only used juvenile *A. brasiliiana* that were found associated with *L. dendroidea* in the field. Thus, young individuals of *A. brasiliiana* are mesograzers that use *L. dendroidea* both food and as a chemical source that protects from predators.

In conclusion, our discovery of *Aplysia* foraging cues reveals that this mollusc uses prey secondary metabolites as foraging cues. The sesquiterpene (+)-elatol can facilitate the encounter of *A. brasiliiana* with *L. dendroidea*, but it is still not known if other compounds are involved in this process. Thus, elatol represents for this alga both an evolved function against natural enemies such as pressure by conusmers [12] and fouling [37], and also a cue that benefits the sea hare *A. brasiliiana*.

## Supporting information

**S1 Table.** NMR data and all the MS and NMR spectra of the isolated compounds 1–5 found in *L. dendroidea*.

(DOC)

## Acknowledgments

We are grateful to the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro and the Project of the Spain National Plan (CTQ2014-55888-C03-01) for financial support. RCP thanks CNPq for Research Productivity fellowships. NN thanks Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for a doctoral fellowship and CNPq for a sandwich doctoral fellowship. We are also grateful to the peer reviewers for the substantial contributions in improving our manuscript.

## Author Contributions

**Conceptualization:** N. Nocchi, A. R. Soares, R. C. Pereira.

**Data curation:** N. Nocchi, A. R. Soares, M. L. Souto, J. J. Fernández, M. N. Martin.

**Formal analysis:** N. Nocchi, A. R. Soares, M. L. Souto, J. J. Fernández, M. N. Martin, R. C. Pereira.

**Funding acquisition:** A. R. Soares, R. C. Pereira.

**Investigation:** N. Nocchi, A. R. Soares, M. L. Souto, J. J. Fernández.

**Methodology:** N. Nocchi, A. R. Soares, M. L. Souto, J. J. Fernández, M. N. Martin, R. C. Pereira.

**Supervision:** A. R. Soares, M. L. Souto, J. J. Fernández, M. N. Martin, R. C. Pereira.

**Writing – original draft:** N. Nocchi.

**Writing – review & editing:** A. R. Soares, R. C. Pereira.

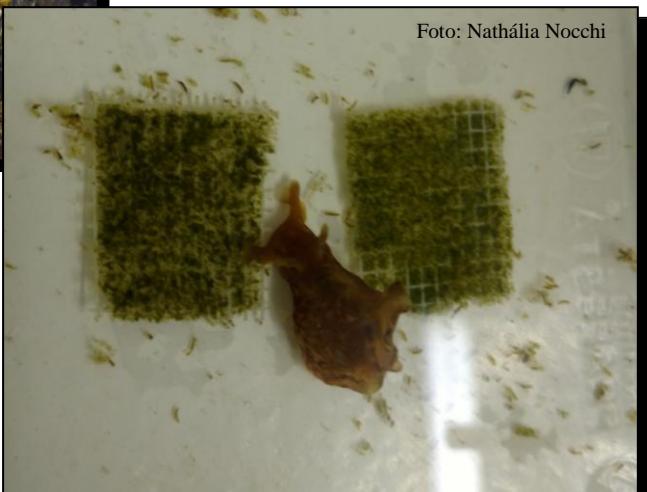
## References

1. Hay ME. Marine chemical ecology: chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Ann Rev Mar Sci*. 2009; 1: 193–212. <https://doi.org/10.1146/annurev.marine.010908.163708> PMID: 21141035
2. Pereira RC, Da Gama BAP. Macroalgal chemical defenses and their roles in structuring tropical marine communities. In: Amsler CD, editor. *Algal chemical ecology*. Springer Berlin Heidelberg; 2008. pp. 25–55.
3. Tebben J, Motti CA, Nachshon Siboni, Tapiolas DM, Negri AP, Schupp PJ, et al. Chemical mediation of coral larval settlement by crustose coralline algae. *Sci Rep*. 2015; 5: 10803. <https://doi.org/10.1038/srep10803> PMID: 26042834
4. Gillette R, Huang RC, Hatcher N, Moroz LL. Cost-benefit analysis potential in feeding behavior of a predatory snail by integration of hunger, taste, and pain. *Proc Natl Acad Sci*. 2000; 97: 3585–3590. PMID: 10737805
5. Zimmer RK, Commins JE, Browne KA. Regulatory effects of environmental chemical signals on search behavior and foraging success. *Ecology*. 1999; 80: 1432–1446.
6. Alino PM, Coll JC, Sammarco PW. Toxic prey discrimination in a highly specialized predator *Chaetodon melannotus* (Block et Schneider): visual vs. chemical cues. *J Exp Mar Biol Ecol*. 1992; 164: 209–220. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(92\)90175-A](https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90175-A)
7. Kamio M, Derby CD. Finding food: how marine invertebrates use chemical cues to track and select food. *Nat Prod Rep*. 2016; 34: 514–528. <https://doi.org/10.1039/C6NP00121A> PMID: 28217773

8. Núñez-Acuña G, Boltaña S, Gallardo-Escárate C. Pesticides drive stochastic changes in the chemoreception and neurotransmission system of marine ectoparasites. *Int J Mol Sci.* 2016; 17: 700. <https://doi.org/10.3390/ijms17060700> PMID: 27258252
9. Wang B, Gloer JB, Ji N, Zhao J. Halogenated organic molecules of Rhodomelaceae origin: chemistry and biology. *Chem Rev.* 2013; 113: 3632–3685. <https://doi.org/10.1021/cr9002215> PMID: 23448097
10. Harizani M, Ioannou E, Roussis V. The *Laurencia* paradox: an endless source of chemodiversity. *Prog Chem Org Nat Prod.* 2016; 102: 91–252. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-33172-0\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-33172-0_2) PMID: 27380407
11. Paradas WC, Tavares Salgado L, Pereira RC, Hellio C, Atella GC, de Lima Moreira D, et al. A novel antifouling defense strategy from red seaweed: exocytosis and deposition of fatty acid derivatives at the cell wall surface. *Plant Cell Physiol.* 2016; 57: 1008–1019. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcw039> PMID: 26936789
12. Pereira RC, Da Gama BAP, Teixeira VL, Yoneshigue-Valentin Y. Ecological roles of natural products from the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. *Braz J Biol.* 2013; 63: 665–672.
13. Pennings SC. Size-related shifts in herbivory: specialization in the sea hare *Aplysia californica*. *J Exp Mar Biol Ecol.* 1990; 142: 43–61. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(90\)90136-Z](https://doi.org/10.1016/0022-0981(90)90136-Z)
14. Rogers CN, Steinberger PD, De Nys R. Factors associated with oligophagy in two species of sea hares. *J Exp Mar Biol Ecol.* 1995; 192: 47–73. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(95\)00057-X](https://doi.org/10.1016/0022-0981(95)00057-X)
15. Kamiya H, Sakai R, Jimbo M. Bioactive molecules from sea hares. In: Cimino G, Gavagnin M, editors. *Molluscs: from chemo-ecological study to biotechnological application*. Springer Berlin Heidelberg; 2006. pp. 215–339.
16. Palaniveloo K, Vairappan CS. Chemical relationship between red algae genus *Laurencia* and sea hare *Aplysia dactylomela* Rang in the North Borneo Island. *J Appl Phycol.* 2014; 26: 1199–1205. <https://doi.org/10.1007/s10811-013-0127-z>
17. Pereira RB, Andrade PB, Valentão P. Chemical diversity and biological properties of secondary metabolites from sea hares of the *Aplysia* genus. *Mar. Drugs.* 2016; 14: 1–33. <https://doi.org/10.3390/MD14020039> PMID: 26907303
18. Ginsburg DW, Paul VJ. Chemical defenses in the sea hare *Aplysia parvula*: importance of diet and sequestration of algal secondary metabolites. *Mar Ecol Prog Ser.* 2001; 215: 261–274.
19. Rogers CN, de Nys R, Steinberg PD. Effects of algal diet on the performance and susceptibility to predation of the sea hare *Aplysia parvula*. *Mar Ecol Prog Ser.* 2002; 236: 241–254.
20. Kamio M, Grimes TV, Hutchins MH, van Dam R, Derby CD. The purple pigment aplysiovioolin in sea hare ink deters predatory blue crabs through their chemical senses. *Animal Behav.* 2010; 80: 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2010.04.003>
21. Derby CD. Escape by inking and secreting: marine molluscs avoid predators through a rich array of chemicals and mechanisms. *Biol Bull.* 2007; 213: 274–289. <https://doi.org/10.2307/25066645> PMID: 18083967
22. Switzer-Dunlap M. Settlement and metamorphosis of marine invertebrate larvae. In Chia FS, Rice ME, editors. *Proc Symp Settl Metamorph Mar Invert Larvae*. American Zoological Society Meeting, Toronto, Ontario, Canada; 1978. pp. 197–208.
23. Machado FLS, Kaiser CR, Costa SS, Gestinari LM, Soares AR. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. *Rev Bras Farmacogn.* 2010; 20: 441–452.
24. Vairappan CS, Suzuki M, Abe T, Masuda M. Halogenated metabolites with antibacterial activity from the Okinawan *Laurencia* species. *Phytochemistry.* 2001; 58: 517–523. PMID: 11557086
25. Bansemir AJN, Michalik MLU, Lalk M. Extracts and sesquiterpene derivatives from the red alga *Laurencia chondrioides* with antibacterial activity against fish and human pathogenic bacteria. *Chem. Biodiv.* 2004; 1: 463–467. <https://doi.org/10.1002/cbdv.200490039> PMID: 1591860
26. Brennan MR, Erickson KL, Minott DA, Pascoe K. O. Chamigrane metabolites from a Jamaican variety of *Laurencia obtusa*. *Phytochemistry.* 1987; 26: 1053–1057.
27. Coll JC, Wright AD. Tropical marine algae. III. New sesquiterpenes from *Laurencia majuscula* (Rhodophyta, Rhodophyceae, Ceramiales, Rhodomelaceae). *Aust J Chem.* 1989; 42: 1591–1603.
28. Wessels M, König GM, Wright AD. New natural product isolation and comparison of the secondary metabolite content of three distinct samples of the sea hare *Aplysia dactylomela* from Tenerife. *J Nat Prod.* 2000; 63: 920–928. PMID: 10924166
29. Vairappan CS. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). *Biomol Engin.* 2003; 20: 255–259. [https://doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00067-4](https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00067-4)

30. da Silva Machado FL, Ventura TL, Gestinari LM, Cassano V, Resende JA, Kaiser CR, et al. Sesquiterpenes from the Brazilian red alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh. *Molecules*. 2014; 19: 3181–3192. <https://doi.org/10.3390/molecules19033181> PMID: 24642907
31. Machado FL, Duarte HM, Gestinari LM, Cassano V, Kaiser CR, Soares AR. Geographic distribution of natural products produced by red algae *Laurencia dendroidea* J. Agardh. *Chem Biodivers*. 2016; 13: 845–851. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201500246> PMID: 27224289
32. da Silva Machado FL, Lima WP, Duarte HM, Rossi-Bergmann B, Gestinari LM, et al. Chemical diversity and antileishmanial activity of crude extracts of *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. *Rev Bras Farmacogn*. 2014; 24: 635–643.
33. da Silva Machado FL, Pacienza-Lima W, Rossi-Bergmann B, de Souza Gestinari LM, Fujii MT, Campos de Paula J, et al. Antileishmanial sesquiterpenes from the Brazilian red alga *Laurencia dendroidea*. *Planta Med*. 2011; 77: 733–735. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250526> PMID: 21058243
34. Nielsen NPV, Carstensen JM, Smedsgaard J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimized warping. *J Chromatogr A*. 1998; 805: 17–35. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00021-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00021-1)
35. Kennedy DJ, Selby IA, Thomson RH. Chamigrane metabolites from *Laurencia obtusa* and *L. scoparia*. *Phytochemistry*. 1988; 27: 1761–1766. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80439-4](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80439-4)
36. Weissburg J. Death from downstream: Chemosensory navigation and predator-prey processes. Brönnmark C, Lars-Anders Hansson L-A, editors. *Chemical ecology in aquatic systems*. Oxford Scholarship Online; 2015.
37. Da Gama BAP, Pereira RC, Carvalho MGV, Coutinho R, Yoneshigue-Valentin Y. The effects of seaweed secondary metabolites on biofouling. *Biofouling*. 2002; 18: 13–20. <https://doi.org/10.1080/08927010290017680>
38. Rasher DB, Stout EP, Engel S, Shearer TL, Kubanek J, Hay ME. Marine and terrestrial herbivores display convergent chemical ecology despite 400 million years of independent evolution. *PNAS*. 2015; 112: 12110–12115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508133112> PMID: 26324909
39. Gavagnin M, Mollo E, Montanaro D, Ortega J, Cimino G. Chemical studies of Caribbean sacoglossans: dietary relationships with green algae and ecological implications. *J Chem Ecol*. 2000; 26: 1563–1578. <https://doi.org/10.1023/A:1005526526884>
40. Dias T, Brito I, Moujir L, Paiz N, Darias J, Cueto M. Cytotoxic sesquiterpenes from *Aplysia dactylomela*. *J Nat Prod*. 2005; 68: 1677–1679. <https://doi.org/10.1021/np050240y> PMID: 16309323
41. Vairappan CS, Anangdan SP, Matsunaga S. Diet-derived halogenated metabolite from the sea hare *Aplysia parvula*. *Malays J Sci*. 2009; 28: 269–273.
42. Jiménez-Romero C, Mayer AMS, Rodríguez AD. Dactylioditerpenol acetate, a new prenylbisabolane-type diterpene from *Aplysia dactylomela* with significant in vitro anti-neuroinflammatory activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2014; 24: 344–348. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.11.008> PMID: 24279991
43. Díaz-Marrero AR, de la Rosa JM, Brito I, Darias J, Cueto M. Dactyliomelatriol, a biogenetically intriguing omphalane-derived marine sesquiterpene. *J Nat Prod*. 2012; 75: 115–118. <https://doi.org/10.1021/np200845f> PMID: 22220686
44. Mollo E, Fontana A, Roussis V, Polese G, Amodeo P, Ghiselin MT. Sensing marine biomolecules: smell, taste, and the evolutionary transition from aquatic to terrestrial life. *Front Chem*. 2014; 2: 1–6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2014.00092> PMID: 25360437
45. Audesirk TE. Chemoreception in *Aplysia californica*. I. Behavioral localization of distance chemoreceptors used in food-finding. *Behav Biol*. 1975; 15: 45–55. PMID: 1237288
46. Carefoot TH, Pennings SC. Influence of proximal stimuli on swimming in the sea hare *Aplysia brasiliiana*. *J Exp Mar Biol Ecol* 2003; 288: 223–237. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(03\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(03)00019-4)
47. Steiger S, Schmitt T, Schaefer HM. The origin and dynamic evolution of chemical information transfer. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 2010; rspb20102285. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2285> PMID: 21177681
48. Saleh N, Scott AG, Bryning GP, Chittka L. Distinguishing signals and cues: bumblebees use general footprints to generate adaptive behaviour at flowers and nest. *Arthropod-Plant Interactions*. 2007; 1: 119–127. <https://doi.org/10.1007/s11829-007-9011-6>
49. Sudatti DB, Fujii MT, Rodrigues SV, Turra A, Duarte HM, Soares AR, et al. Diel variation of sesquiterpene elatol production: a chemical defense mechanism of the red seaweed *Laurencia dendroidea*. *Biochim Syst Ecol*. 2016; 64: 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.12.001>
50. Salgado LT, Viana NB, Andrade LR, Leal RN, da Gama BA, Attias M et al. Intra-cellular storage, transport and exocytosis of halogenated compounds in marine red alga *Laurencia obtusa*. *J Struct Biol*. 2008; 162: 345–355. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2008.01.015> PMID: 18337120

51. Sudatti DB, Rodrigues SV, Coutinho R, Da Gama BA, Salgado LT, et al. Transport and defensive role of elatol at the surface of the red seaweed *Laurencia obtusa* (Ceramiales, Rhodophyta). *J Phycol.* 2008; 44: 584–591. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00507.x> PMID: 27041418
52. Sudatti DB, Rodrigues SV, Pereira RC. Quantitative GC-ECD analysis of halogenated metabolites: determination of surface and within-thallus elatol of *Laurencia obtusa*. *J Chem Ecol.* 2006; 32: 835–843. <https://doi.org/10.1007/s10886-006-9033-z> PMID: 16718572
53. Pennings SC, Nastisch S, Paul VJ. Vulnerability of sea hares to fish predators: importance of diet and fish species. *Coral Reefs.* 2001; 20: 320–324. <https://doi.org/10.1007/s003380100178>
54. Pennings SC. Size-related shifts in herbivory: specialization in the sea hare *Aplysia californica* Cooper. *J Exp Mar Biol Ecol.* 1990; 142: 43–61. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(90\)90136-Z](https://doi.org/10.1016/0022-0981(90)90136-Z)
55. Hay ME. Seaweed chemical defenses: their role in the evolution of feeding specialization and in mediating complex interactions. In Paul VJ, editor. *Ecological roles of marine natural products.* Comstock Publishing Associates; 1992. pp. 93–118.



## CAPÍTULO IV

---

**Induce chemical defenses in the red alga  
*Laurencia dendroidea* by direct grazing and  
waterborne chemical cues**

Artigo em processo de submissão

**INDUCED CHEMICAL DEFENSES IN THE RED SEAWEED *Laurencia dendroidea*  
BY DIRECT GRAZING AND WATERBORNE CHEMICAL CUES**

***Nathália Nocchi<sup>1,2</sup>, Renato Crespo Pereira<sup>1</sup>, Heitor M. Duarte<sup>2</sup>&  
Angélica Ribeiro Soares<sup>2</sup>***

<sup>1</sup>Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós graduação em Dinâmica do Oceano e da Terra, Avenida General Milton Tavares de Souza, Campus da Praia Vermelha, 24210-346, Niterói, Brazil

<sup>2</sup>Grupo de Produtos Naturais de Organismos Aquáticos (GPNOA), NUPEM, Universidade Federal do Rio de Janeiro - Campus Professor Aloísio Teixeira, Av. São Jose Do Barreto, 764, 27965 – 045, Macaé, RJ, Brazil.

**ABSTRACT**

Inducible seaweed chemical defense is more common in temperate species, and detected by changes in phlorotannin contents or indirectly measured by differential consumption by herbivores of live tissues or artificial food containing algal extracts. In addition, seaweed induced chemical defense has frequently been reported to occur 11-20 days after artificial damage or direct herbivory action. Here, we used manipulative laboratory experiments to assess induced chemical defense in the tropical red seaweed *Laurencia dendroidea* in response to direct grazing, chemical cues from grazed conspecific neighbor and presence of herbivorous. Inducible defense was evaluated by palatability of artificial food containing extracts of assayed *L. dendroidea* offered to herbivorous sea hare *Aplysia brasiliiana* and comparative analyzes of the chemical profile of lipophilic extracts of this seaweed by GC/MS and metabolomic approach by PCA. Our results revealed that grazing by *A. brasiliiana* induced a fast (after 48h) anti-herbivory resistance trait in individuals of *L. dendroidea* directly consumed and also in response to chemical cues from grazed conspecifics, but not to presence of this sea hare. This increase in grazer resistance was accompanied by changes in the sesquiterpene metabolic profile of this seaweed. These findings reveal that induced defense in seaweeds: 1) may be more widespread among seaweeds, regardless of latitude; 2) involve changes in other classes of substances besides phlorotannins; and 3) may be a faster and more ecologically coherent process as an immediate response to consumers.

**KEYWORDS:** Induced chemical defense, sesquiterpenes, metabolomic, chemical cue, herbivory.

## INTRODUCTION

Herbivory is the major biological factor capable of generating a significant impact on seaweed and, consequently, assumed to be an important selective force driving chemical defense production in these organisms (PEREIRA *et al.* 2017). A large variety of green, brown and red seaweeds are known to produce chemical defenses against herbivory that deter feeding by invertebrate and vertebrate marine grazers (PEREIRA & DA GAMA 2008).

The amount of the seaweed chemicals is not an absolute or inexorable characteristic of a given species, and they can be categorized as constitutive or induced according to changes in concentrations and also based on the assumption that production, storage or degradation are costly. While constitutive defenses can be permanently expressed on an active level, the induced ones are produced only as direct response to herbivory or imminent consumption (TOTH *et al.* 2005). Then, the induced chemical defense is a strategy that minimizes cost since it is not stored, but only produced when necessary or stimulated (CRONIN, 2001).

The first studies that demonstrated the occurrence of induced chemical resistance against herbivory in seaweeds, showed that artificial clipping of *Fucus distichus* and *F. vesiculosus* resulted in increased levels of phlorotannins capable to inhibit the consumption by the gastropods *Littorina sitkana* and *L. littorea* (VAN ALSTYNE 1988; YATES & PECKOL 1993). Artificial clipping used in several other studies failed to find induced production of secondary metabolites in seaweeds (e.g., PAUL & VAN ALSTYNE 1992; PFISTER 1992; STEINBERG 1994). Further and more realistic experimental approach revealed that the brown seaweed *Dictyota menstrualis* responded by increasing their content of defensive diterpene alcohols to direct feeding by the amphipod *Amphitoe longimana* (CRONIN & HAY 1996).

Although sometimes conflicting, induced chemical defenses in seaweeds in response to direct grazing or artificial clipping is a well-demonstrated process in seaweeds (see TOTH & PAVIA 2007; JORMALAINEN & HONKANEN 2008; for reviews). However, the inducible chemical defense is confirmed and common in temperate brown seaweeds, but only rare or few evaluated in green and red ones and in species from broad latitudinal levels (TOTH & PAVIA, 2007; JORMALAINEN & HONKANEN 2008).

Seaweed induced chemical defenses may be also promoted by info-chemicals. Almost 20 years ago, it was demonstrated that the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* responded

to water-borne chemical cues released by periwinkle-grazed conspecific neighbors by increase of phlorotannin production (TOTH & PAVIA 2000). Further studies also reported that water-borne cues are capable to induce chemical defenses in several green, red and mainly brown seaweed species (ROHDE *et al.* 2004; MACAYA *et al.* 2005; DIAZ *et al.* 2006; TOTH 2007; YUN *et al.* 2007, 2012). However, some studies failed to detect induction of anti-herbivory traits after exposure to info-chemicals (SOTKA *et al.* 2002). In addition, the communication among neighbors seaweeds may be dependent of the attacked seaweed species (YUN *et al.* 2012) and the attacking herbivore species (ROHDE *et al.* 2004). However, the ability to increase the level of defense before an actual attack allows the cue-receiving individual not only avoid the costs of constitutive defenses, but also to avoid the fitness costs of biomass loss during the first encounter with grazers, as occurs when defense is induced by direct grazing (KARBAN 2011).

Most of the studies on induced seaweed chemical defenses evaluated changes in amount of total phlorotannin (= polyphenols) analyzed by colorimetric method as response to direct or indirect herbivory action (e.g. TOTH & PAVIA 2000). Other studies detected induced chemical defense by evaluation of differential consumption of reconstituted pellet food containing chemicals from grazed and ungrazed seaweeds (e.g. FLÖTHE *et al.* 2004) or measurement of differential consumption of manipulated live seaweeds by herbivores (WEIDNER *et al.* 2004). Then, there is absence of studies about identity of specific chemical compounds induced by direct or indirect action of herbivory. To our knowledge, only a recent study verified induced production of the sesquiterpene elatol by simulated herbivory, presence of epibionts, and bacterial infestation in clones of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (SUDATTI *et al.* submitted).

Red seaweeds of the genus *Laurencia* are known as one of the most prolific producer of secondary metabolites (HARIZANI *et al.* 2016) and these chemicals may exhibit significant ecological roles as antifouling (e.g. DA GAMA *et al.* 2002), and defense against various herbivores, such as amphipod (ARGANDOÑA *et al.* 1993), molluscs (GRANADO & CABALLERO 1995), sea-urchin (PEREIRA *et al.* 2003), reef fishes (HAY *et al.* 1987) and crustaceans (PEREIRA *et al.* 2003). However, species of *Laurencia* are part of the diet of sea hare *Aplysia* molluscs (sea hares), especially in its juvenile stages of development (NADEAU *et al.* 1989; PAWLICK 1989; PENNINGS 1990). Although the close trophic relationship between *Aplysia* and *Laurencia* is known for long time, most studies have focused only on secondary metabolites and the bioprospecting of bioactive molecules of these organisms (e.g.

MACHADO *et al.* 2010; HARIZANI *et al.* 2016; PEREIRA *et al.* 2016). But recent study revealed that the sesquiterpene (+)-elatol produced by the red seaweed *Laurencia dendroidea* is a chemical cue capable to attract the associated sea hare *Aplysia brasiliiana* (NOCCHI *et al.* 2017). This is evidence that seaweeds can be appropriate organisms to study plant–plant signaling in response to herbivory because they grow as dense aggregates and hosts a rich fauna associated. In addition, mesoherbivores (like young *A. brasiliiana*) are considered the main inducers of defensive chemicals in seaweeds (HAY 1992).

Manipulative laboratory experiments were used in this study to assess induced chemical defense in the red seaweed *L. dendroidea* by (1) direct grazing by *Aplysia brasiliiana* (2) water-borne chemical cues from conspecific neighbors grazed by this sea hare and (2) only presence of this mollusk.

## METODOLOGY

### *Sampling sites and organisms*

Sporophyte specimens of the red seaweed *Laurencia dendroidea* were randomly collected by free-diving during low tide in depths from 0-2 m between August and September 2014 at two different regions in the Rio de Janeiro State (Brazil); intertidal zone at Forno Beach (ForBuz), Armação dos Búzios ( $22^{\circ}45'43.07"S$ ,  $41^{\circ}52'30.25"W$ ) and Santana Island Beach (SIMac), Macaé ( $22^{\circ}24'36.15"S$ ,  $41^{\circ}42'35.27"W$ ). All specimens were removed by hand from the substratum, and immediately placed in portable aquaria with seawater containing aeration and transported within 3h to the laboratory, where they were maintained in incubation systems under constant temperature ( $22^{\circ}\text{C}$ ), aeration, salinity (35), and 12 h:12 h light:dark photoperiod. The seawater was changed every 24 h before the start the bioassays.

Specimens of the sea hare *Aplysia brasiliiana* in juvenile stages of development ( $2.0 \pm 0.6$  cm length) and naturally living associated to *L. dendroidea* in the intertidal zone at ForBuz were collected by free-diving for use in bioassays. Immediately after collection, the organisms were placed in distinct portable aquaria with aerated seawater and transported within 3h to the laboratory. In the laboratory, they were maintained in incubation systems with constant temperature ( $22^{\circ}\text{C}$ ), aeration, salinity (35), and 12h:12h light:dark photoperiod and fed with green seaweed *Ulva*. The seawater was changed every 24 h before the start of the

bioassays and for each bioassay new individuals of *A. brasiliiana* were collected and maintained under these laboratory conditions.

#### *Induced chemical defense bioassays*

Induced chemical defense bioassays were conducted using two distinct populations of *L. dendroidea*, but were used only specimens of *A. brasiliiana* from Búzios to evaluate the induced response or chemical profile change in this seaweed by direct grazing or waterborne cue; then, sympatric (for *L. dendroidea* ForBuz) and allopathic (for *L. dendroidea* SIMac). A total of 10 specimens of *L. dendroidea* from each population (ForBuz and SIMac) and 20 individuals of *A. brasiliiana* (ForBuz) were used in each bioassay and they were collected one day before the beginning of the bioassays.

Each algal replicate (ForBuz=  $5.15 \pm 1.57$  g of wet weight and  $8.2 \pm 1.3$  cm of length and SIMac=  $3.45 \pm 1.23$  g wet weight,  $4.2 \pm 1.23$  cm of length) was divided into four equal pieces (“clones”) in order to neutralize genetic variability. All specimens thus obtained were acclimatized for 48h (acclimatization phase) under the laboratory experimental conditions in the absence of consumers to allow relaxation (or deactivation) or recovery of the unknown natural chemical defense levels.

The bioassay (treatment phae) set-up consisted of a flow-through system with a total of 40 experimental units (EUs), comprised rectangular transparent plastic aquaria ( $12 \times 18 \times 11$  cm, volume= 1 L each), for each population of *L. dendroidea*. Each EU was divided into two equal-sized compartments by a vertical perforated PVC mesh (< 1 mm) that allowed flowing of seawater from upstream to downstream compartment, with regulated by flow controllers at flow rate of  $2\text{mL}^{-\min}$ ; upstream correspond the water inlet compartment, while the downstream receive water from upstream from one side and discarded it in the opposite side. The seawater was stored in upper aquarium (150 L) to individually supply the EU by connected tubes (effective diameter= 0.4 cm). This individual unidirectional water flow-through system was used to prevent cross-contamination of potential waterborne chemical cue between *L. dendroidea* specimens of each EU.

After the acclimation phase (48h), *L. dendroidea* specimens were exposed to different treatments to assess the responses by direct grazing, chemical cues from grazed neighbor conspecific and presence of *A. brasiliiana*. In each treatment-type, one specimen of *L.*

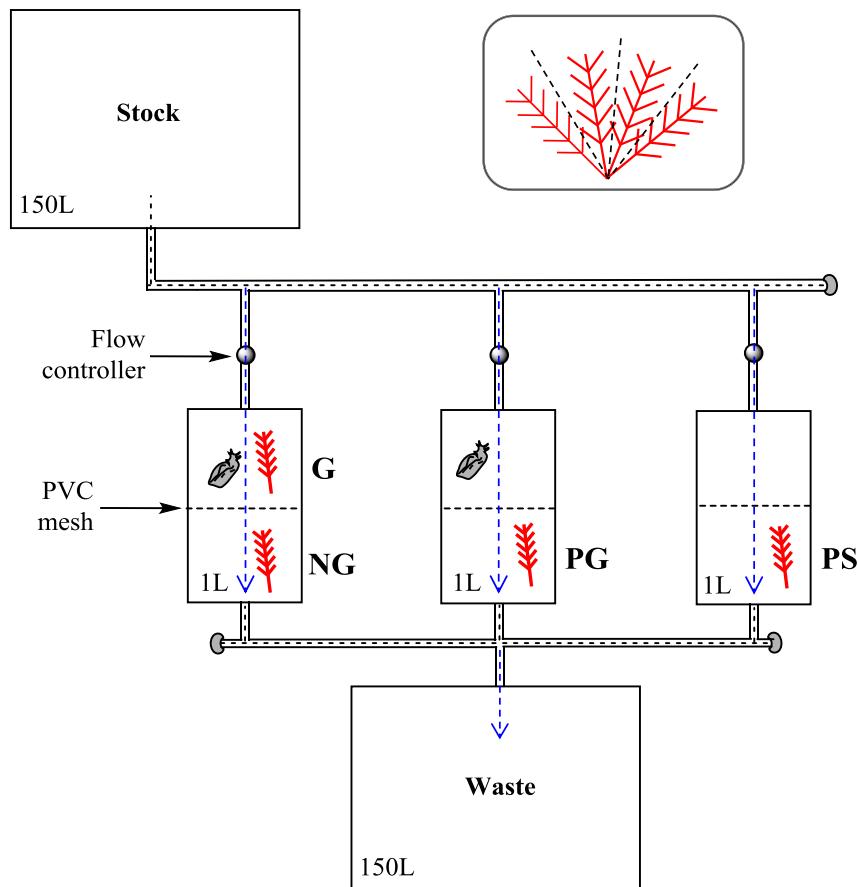
*dendroidea* was concomitantly exposed to four treatments, grazer (G), neighbor grazer (NG), presence of grazer (PG) and pure seawater (PS) in EU distributed as follows (10 individuals of *L. dendroidea* for each treatment= total of 40 UEs for each population of *L. dendroidea* – ForBuz and SIMac (Figure 1).

Grazer (G) and neighbor grazer (NG) treatment assays (n= 10): two specimens of *L. dendroidea* were arranged in the same EU, but separated by PVC mesh. One specimen of *L. dendroidea* was placed in direct contact with *A. brasiliana* in the upstream compartment to evaluate induced chemical defense by direct grazing (G), while the other individual was maintained alone (NG) in downstream compartment, but receiving seawater from the upstream compartment to evaluate the possible action of waterborne chemical cues released from grazed adjacent alga (from G assay).

Presence of grazer (PG) treatment assay (n= 10): In the same EU, one specimen of *A. brasiliana* was kept alone in the upstream, separated by a PVC mesh from one specimen of *L. dendroidea* maintained in the downstream compartment to evaluate whether this seaweed would be able to detect some chemical cues released by this sea hare, even without direct contact with it.

Pure seawater (PS) treatment assay (n= 10): Control for the three previous EU (G, NG, and PG), in which one specimen of *L. dendroidea* was placed in downstream compartment, separated by PVC mesh from the upstream empty compartment.

The treatment phase was maintained for two distinct time periods, 24h (n= 5) and 72h (n= 5) for the SIMac population of *L. dendroidea*; and 24h (n= 4), 48h (n= 3) and 72h (n= 3) for the ForBuz population of *L. dendroidea*. These periods were established after the detection of consumption in EU “grazing - G” treatment. At the end of treatment phase, feeding choice assays were run to test for differences in palatability and metabolomic analysis to evaluate the metabolic variation in chemical profile (see below).



**Figure 1.** Experimental set-up design of the unidirectional flow-through system used to evaluate induced chemical defense in *L. dendroidea*. Each specimen of *L. dendroidea* was divided into four equal pieces (top right of the figure) and exposed concomitantly to different treatments in four experimental units (EU): G, NG, PG and PS, in EU divided into two equal-sized compartments by a PVC mesh. G= grazer, NG= neighbor grazer, PG= presence of grazer and PS= pure seawater. Each EU was replicated 10 times (individuals of *L. dendroidea*). Blue arrows indicate the flow direction of the seawater from the aquarium stock to waste recipient.

#### Chemical extraction

The crude extracts of the specimens of *L. dendroidea* used in palatability assays and for chemical profile analyses were obtained by extraction of them for two times in AcOEt:MeOH (1:1) (high-performance liquid chromatography - HPLC grade, Tedia) during 24h and in a ultra-sound apparatus for 10 min each extraction. Obtained samples were filtered and dried by rotatory evaporation. The ratio between the volume of water displaced by *L. dendroidea* assayed by volume of solvent ( $v/v$ , 1v/3v) was employed to standardize the extraction procedure.

### *Palatability assays*

Artificial food containing lipophilic extracts (treatments) of *L. dendroidea* (ForBuz and SIMac) assayed (G, NG, PG and PS) and corresponding control were simultaneously offered to sea hare *A. brasiliiana* in two-way choice assays to verify the occurrence of the induced chemical defense in response to these treatments; except for *L. dendroidea* (SIMac - from G treatment) assayed for 72h, because the low biomass to be tested. For *L. dendroidea* (SIMac) the assays were performed with sympatric *A. brasiliiana*, while for that assays with *L. dendroidea* (SIMac) were used allopatric individuals of this sea hare.

The artificial foods (treatment and control) were prepared by usual method (see Hay *et al.* 1998). Extracts were solubilized in dichloromethane and the obtained concentration of the extract (concentration of extract was determined as the extract weight equivalent to the wet weight of extracted seaweed) was incorporated into a powder of the chemically undefended food alga *Ulva* that was equivalent to the weight of the original biomass of assayed *L. dendroidea* extracted. This procedure allowed the hydrophobic components of the crude extracts to adhere to the surface of *Ulva* (HAY *et al.* 1998) after the solvent be removed at room temperature. The same procedure was performed for the artificial control food, but using only solvent and without the incorporation of the crude extract. Powdered *Ulva* was incorporated into agar-based artificial food and this mixture was poured over a plastic screen mesh ( $\sim 1 \text{ mm}^2$  per square) and flattened between two layers of wax paper. After cooling and solidification, the screen mesh was cut into squares strips  $10 \times 10 \text{ mm}$ .

Treatment and control artificial foods were simultaneously offered to an individual sea hare per EU. Sea hares were not used for more than one assay and *Ulva* diet in which they were kept in the laboratory was stopped 12h before the assays. To reduce the variability caused by differences between grazers, we prepared three assays for each experimental replicate of the each UE, calculated the consumption in percent and ran the statistical analysis using the mean consumption of each replicate.

The consumption of the artificial food was estimated by score the number of food consumed in squares of the screen mesh. A fixed-consumption stopping rule was applied (LOCKWOOD, 1998), in which all assays were finished when once  $N > 50\%$  of the total food had been consumed. Data were analyzed using the Student's t test for paired samples because datasets presented homoscedasticity and normal distribution ( $\alpha > 0.05$ ).

The percentage (%) of food preference was calculated as: % of consumption= artificial food treatment/artificial food control x 100 and analyzed using ANOVA (One Way Analysis of Variance) test followed by Tukey's post hoc test ( $\alpha > 0.05$ ).

### *Chemical profile analysis and metabolomic studies*

In order to evaluate the effects of the manipulative experiments on the chemical profile and metabolomic of *L. dendroidea*, the crude extracts from each assays (G, NG, PG and PS) were analyzed by gas chromatography (GC). Prior to injection, the crude extracts were diluted in dichloromethane (HPLC, Tedia) and filtered in a 0.45- $\mu\text{m}$  PTFE syringe filter (Millipore, USA) for removal of the more polar constituents, and then the solvent was evaporated. Subsequently, the samples were lyophilized over night to eliminate humidity, and then were resuspended in ethyl acetate (HPLC grade, Tedia) to a final concentration of 1 mg mL<sup>-1</sup>.

The crude extracts were analyzed by two different GC methods (I and II). The chemical profiles of the individuals of *L. dendroidea* (SIMac) were obtained by method I: a GC-2010 Shimadzu with an AOC 20i autosampler and equipped with a mass (MS) detector in the electron impact mode (70 eV). For chromatographic separation was used a capillary column Rtx-5MS (60 x 0.25 mm; film thickness: 0.1  $\mu\text{m}$ ; Restek Corp., Bellefonte, PA, USA). The oven temperature was programmed to hold at 100 °C for 4 min, and increase to 300 °C at a rate 8 °C min<sup>-1</sup>. The injector temperature has been programmed to 260 °C and the detector to 300 °C. The carrier gas was helium with a total flow of 7 mL min<sup>-1</sup>. Detection was performed in the full scan mode, using a mass amplitude of 45-900 *m/z*. Samples were injected in split mode (1  $\mu\text{L}$ , 1:1 ratio). Each sample was analyzed in duplicate. The chemical profiles of the individuals of *L. dendroidea* (ForBuz) were obtained by method II: a GC-2010 Shimadzu with an AOC 20i autosampler and equipped with a flame ionization (FID) detector. For chromatographic separation was used a capillary column DB-5 (30 x 0.25 mm; film thickness: 0.25  $\mu\text{m}$ ). The oven temperature was programmed to hold at 100 °C for 4 min, increase to 300 °C at a rate 8 °C min<sup>-1</sup> and maintained at 300 °C for 10 minutes. The injector temperature has been programmed to 260 °C and the detector to 300 °C. The carrier gas was nitrogen with a total flow of 18.9 mL min<sup>-1</sup>. Samples were injected in split mode (8  $\mu\text{L}$ , 1:5 ratio). Subsequently, to obtain the metabolites mass spectra of this population, after the statistical analysis of the chemical profile, the extracts from the most representative *L.*

*dendroidea* individuals from each UE (greater differentiation), were analyzed under the same conditions described above (method II), by GC/MS. Each sample was analyzed in duplicate.

The comparison of among the chemical profiles of each specimen of *L. dendroidea* (SIMac and ForBuz) assayed was performed by GC/MS database constructed with *L. dendroidea* sesquiterpenes isolated from previous study (NOCCHI *et al.*, 2017). The extracts with highest similarity were analyzed separately under the same chromatographic conditions of the crude extracts, at a concentration of  $0.1\text{mg.mL}^{-1}$ , for comparison by retention time (RT). In addition, the presence of compounds in each sample of *L. dendroidea* was confirmed by the chromatographic analysis of the crude extract ( $0.5\text{ mg.mL}^{-1}$ ) enriched with  $0.1\text{ mg.mL}^{-1}$  of the isolated compound.

The metabolomic of the individuals of each population of *L. dendroidea* (SIMac and ForBuz) was evaluated using the chemometric analysis of Principal Components Analysis (PCA) on the chromatograms obtained. The first step to prepare the data for PCA was the alignment of the chromatograms of each population according to the baseline and the time shift of peaks among, and then correction by the correlation-warping (COW) algorithm (see NIELSEN *et al.* 1998). Data peak intensity were extracted from each chromatogram and placed in a matrix containing all samples, and the first 13 min and the last 5 min of the retention time (RT) were removed of two-dimensional matrices of the chromatograms of each extract of *L. dendroidea* (SIMac). For the chromatograms of extracts from *L. dendroidea* (ForBuz), it was removed the first 10 min of RT of two-dimensional matrices. These procedures were performed since the initial region of the chromatograms showed characteristic peaks of the solvent and the final region did not show peak intensities. For the chromatograms of the *L. dendroidea* (SIMac), besides the removal of the initial and final minutes, the time interval referring to the elatol peak (16.50 to 16.61 min), the major metabolite in this population, was withdrawn from the matrix due to the effect caused by the high intensity of this compound in the results, masking the results of the other peaks (minority) in the analysis and because there was no differences between the UEs (Table 1).

Average value of each duplicate was calculated and, the chromatograms were normalized by the highest peak between them, adjusting the proportional information between the heights of the peaks. The matrix with all chromatograms of each population had its centralized media before executing the PCA, which was performed using the R language (<http://www.R-project.org>) with the installed package "ChemometricPSithR" (WEHRENS,

2011). The results were represented by scatter plots of the scores of the principal components for visualization of the discriminant pattern of the analyzed samples. Loading graphs against the retention time of the compounds were used to visualize the main compounds responsible for the discrimination of the samples. The significance of the separation of the samples in the PCA was evaluated using the Student's t test for scores obtained from in the principal component ( $\alpha > 0.05$ ).

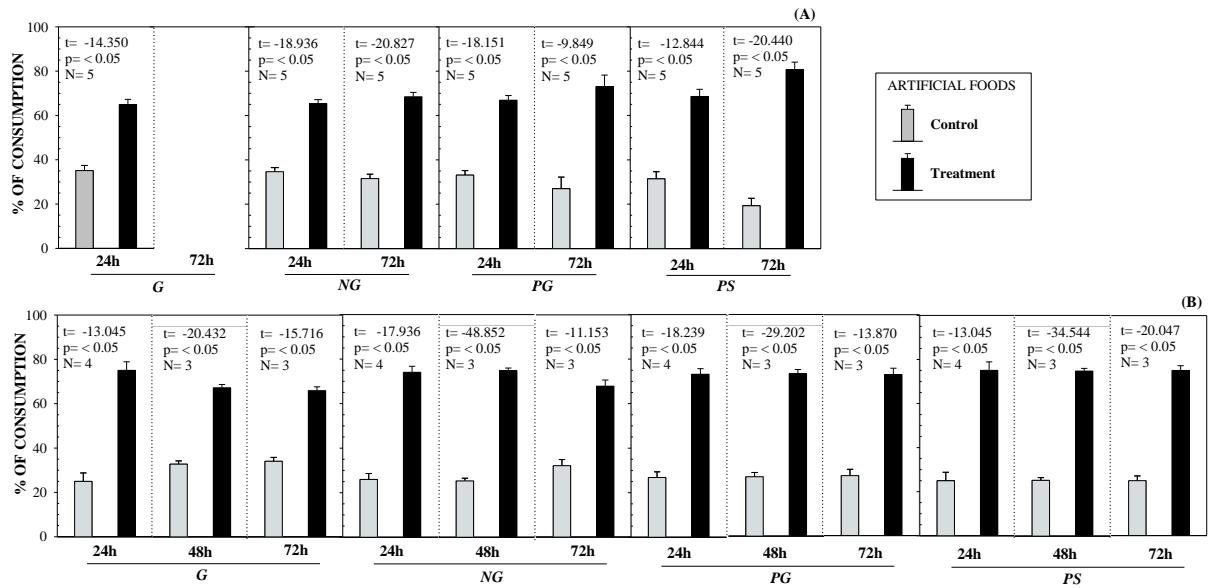
**TABLE 1.** Comparison of the elatol area units in the experimental units tested in the induction bioassays using *L. dendroidea* SIMac. Sesquiterpene elatol is the major metabolite in specimens of this population. **G**= grazing by *A. brasiliiana*, **NG**= neighbor grazing, **PG**= presence of grazer and **PS**= pure seawater. The ANOVA variance test was used to compare the experimental units at each time analyzed. Student's t-test was used to compare the experimental units individually in the times analyzed ( $\alpha > 0.05$ ). Values represent mean area units by CG/MS analysis, and  $\pm$  standard deviation.

Time	Treatments				<i>ANOVA</i>
	G	NG	PG	PS	
<b>24h</b>	19423797 $\pm$ 13435123	24867651 $\pm$ 19036006	32621719 $\pm$ 10559038	16974772 $\pm$ 11495336	$p = 0.334$
<b>72h</b>	13925880 $\pm$ 9184380	12838212 $\pm$ 8588153	20743384 $\pm$ 12380133	23161822 $\pm$ 13496491	$p = 0.442$
<b><i>t</i> Test</b>	$p = 0.472$	$p = 0.284$	$p = 0.141$	$p = 0.458$	

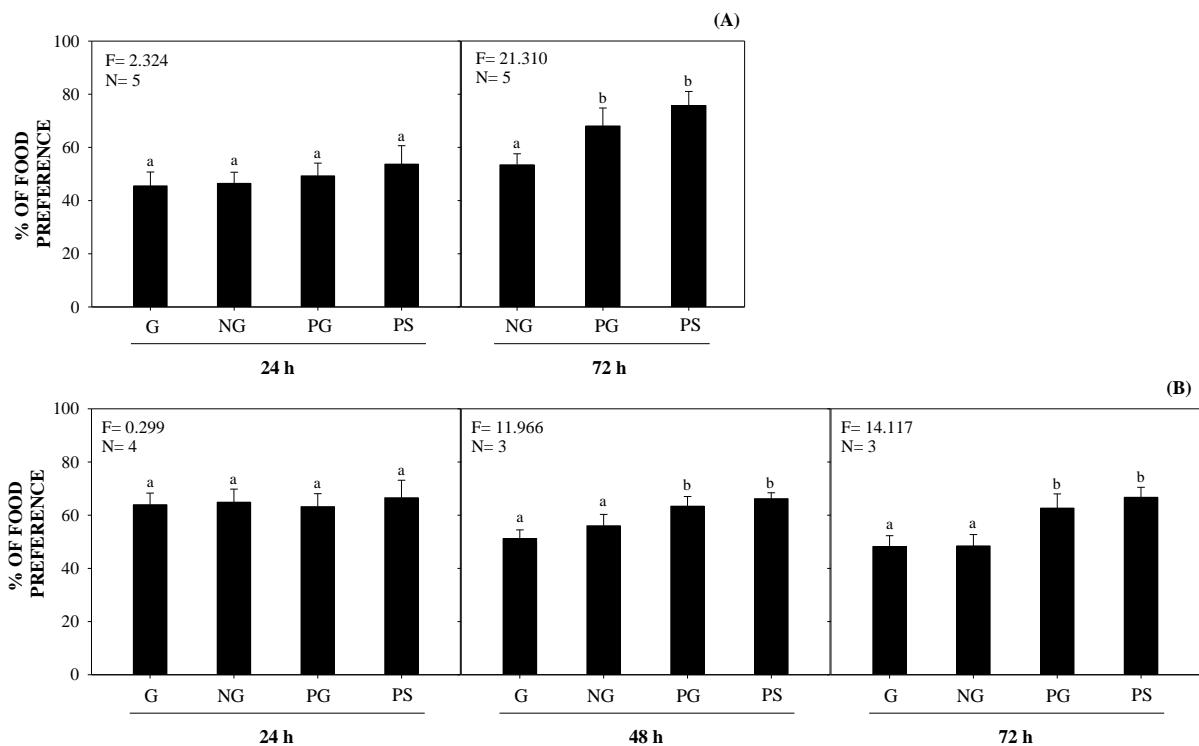
## RESULTS

### *Palatability assay*

All individuals of *A. brasiliiana* were stimulated by the crude extracts of *L. dendroidea*, since artificial food treatments were always more significantly consumed than their corresponding controls, independent of the UEs (G, NG, PG or PS), times of induction and population analyzed – SIMac and ForBuz ( $p < 0.05$ , Fig. 2).



**Figure 2.** Percentage consumption of artificial foods containing extracts of *L. dendroidea* submitted to the bioassay for induction of defenses by *A. brasiliiana*: (A) SIMac (B) ForBuz. Values represent means and standard deviation. Differences were evaluated by Student *t* test for paired samples ( $p < 0.05$ ). C= Control artificial food and T= Treatment artificial food; G= graizer, NG= neighbor graizer, PG= presence of graizer and PS= pure seawater.



**Figure 3.** Percentage consumption of artificial food containing extract of *L. dendroidea* submitted to 4 treatments (G, NG, PG and PS): (A) SIMac (B) ForBuz. Differences were evaluated by the ANOVA, where distinct letters represent significant differences between the samples ( $p < 0.05$ ). Other legends as in Figure 2.

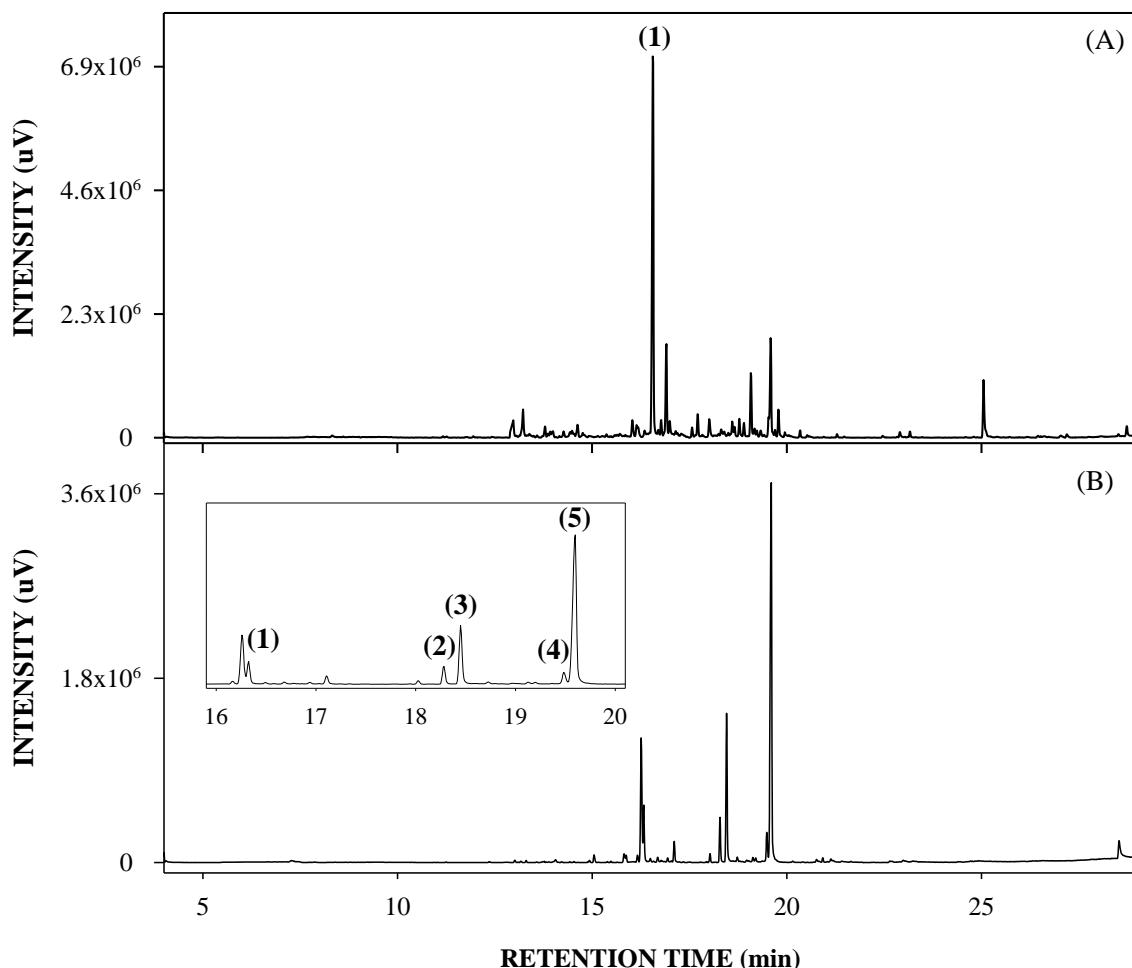
When compared the percent of food preference of the UEs in 24h, it was verified that G, NG and PG not induced resistance in the two populations of *L. dendroidea* (ForBuz and SIMac), since there was non-significant difference between these treatments and PS ( $p > 0.05$ , Figs. 3A and 3B). After 48h, it was observed an induced resistance evidenced by a significant decrease in the food preference of sympatric *A. brasiliiana* on grazed (G) samples of ForBuz population, reducing 15.0 % in food preference in relation to that from pure seawater - PS ( $p < 0.05$ , Fig. 3B). In addition to direct grazing, resistance in *L. dendroidea* was also induced by waterborne signal originating from grazed conspecifics, when significant reduction of the 10% in food preference was also observed in samples from neighbor grazing (NG) in this same population of *L. dendroidea* ( $p < 0.05$ , Fig. 3B). After 72 hour, the reduced preference of *A. brasiliiana* by grazed (G) and neighbor grazing (NG) was significantly lower in the ForBuz population (reduction of the 18.5%,  $p < 0.05$ , and reduction of the 18.3%,  $p < 0.05$ , respectively; Fig. 3B). Similarly, this pattern was also detected in the food preference of allopatric *A. brasiliiana* on SIMac samples after 72h; food preference by samples from neighbor grazing (NG) was reduced in 22.4% ( $p < 0.05$ . Fig. 3A) compared to that from pure seawater (PS). The defensive induction was triggered by either direct grazing or water-borne cues from grazing in neighbor grazing samples, but only herbivore presence did not affect the preference, because the % food preference response of the PG extracts did not differ from the food preference of algae reared in the pure seawater in two populations and at all times tested (Fig. 3A and 3B).

#### *Chromatographic chemical profiles and metabolomic studies*

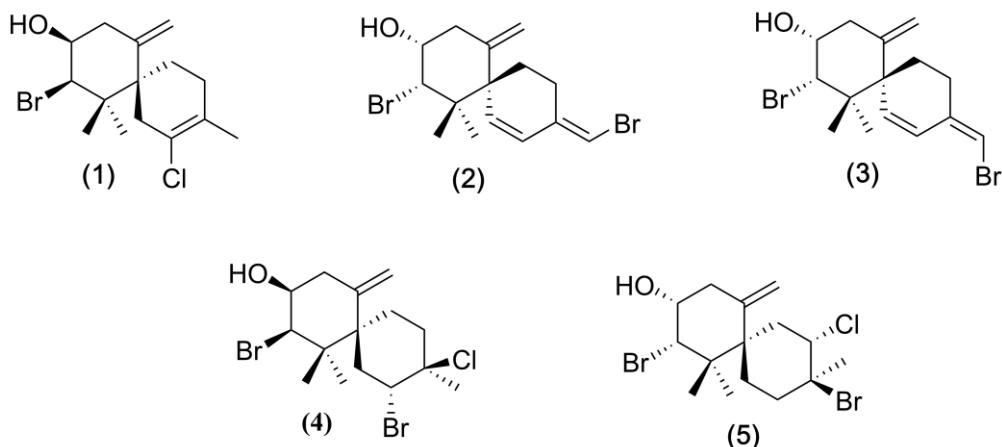
##### *Chemical profile of L. dendroidea*

GC/MS and the chemical profile comparison revealed quantitative and qualitative differences between the populations of *L. dendroidea* (Fig. 4A and 4B). Among all compounds detected in the chemical profile of each population, compared peak-by-peak, it was possible to identify four sesquiterpenes by GC/MS database of the *L. dendroidea* (NOCCHI *et al.* 2017), followed by co-injection of the external standards for confirmation, they are: elatol (**1**) ( $RT_{method\ I} = 16.325$  min; MS Spectrum in SI.1), the enantiomers (*E*)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (**2**) ( $RT_{method\ I}= 18.283$  min; MS Spectrum in SI.2) and (*Z*)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (**3**) ( $RT_{method\ I} = 18.450$  min; MS Spectrum in SI.3), rogiolol ( $RT_{method\ I} = 19.483$  min; MS

Spectrum in SI.4) and the obtusol (**5**) ( $RT_{method\ I} = 19.600$  min; MS Spectrum in SI.5) (Fig. 5). In both populations of *L. dendroidea*, the major compounds are sesquiterpenes, but they are structurally distincts. While in the SIMac population the major compound is elatol (**1**), in the FornBuz the obtusol (**4**) is the major sesquiterpene (structures in Figure 5); elatol (**1**) is present in the FornBuz population, but as minor compound, besides the enantiomers (E) -10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3 (15), 7 (14)-triene (**2**) as the second major compound and (Z) -10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3 (15), 7 (14)-triene (**3**), and rogiolol (**5**) also minority (structures in Figure 5).



**Figure 4.** GC/MS chemical profile of *L. dendroidea* SIMac (A) and ForBuz (B), highlighting the presence of the sesquiterpenes: elatol (**1**), (Z)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (**2**), (E)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (**3**), rogiolol (**4**) and obtusol (**5**) in specimens of each population. Crude extracts analyzed by method I.



**Figure 5.** Chemical structures of sesquiterpenes from *L. dendroidea* populations (SIMac and FORBuz) used as standards: elatol (**1**), (Z)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (**2**), (E)-10,15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3(15),7(14)-triene (**3**), rogiolol (**4**) and obtusol (**5**).

#### *Effect of grazing on metabolites of L. dendroidea*

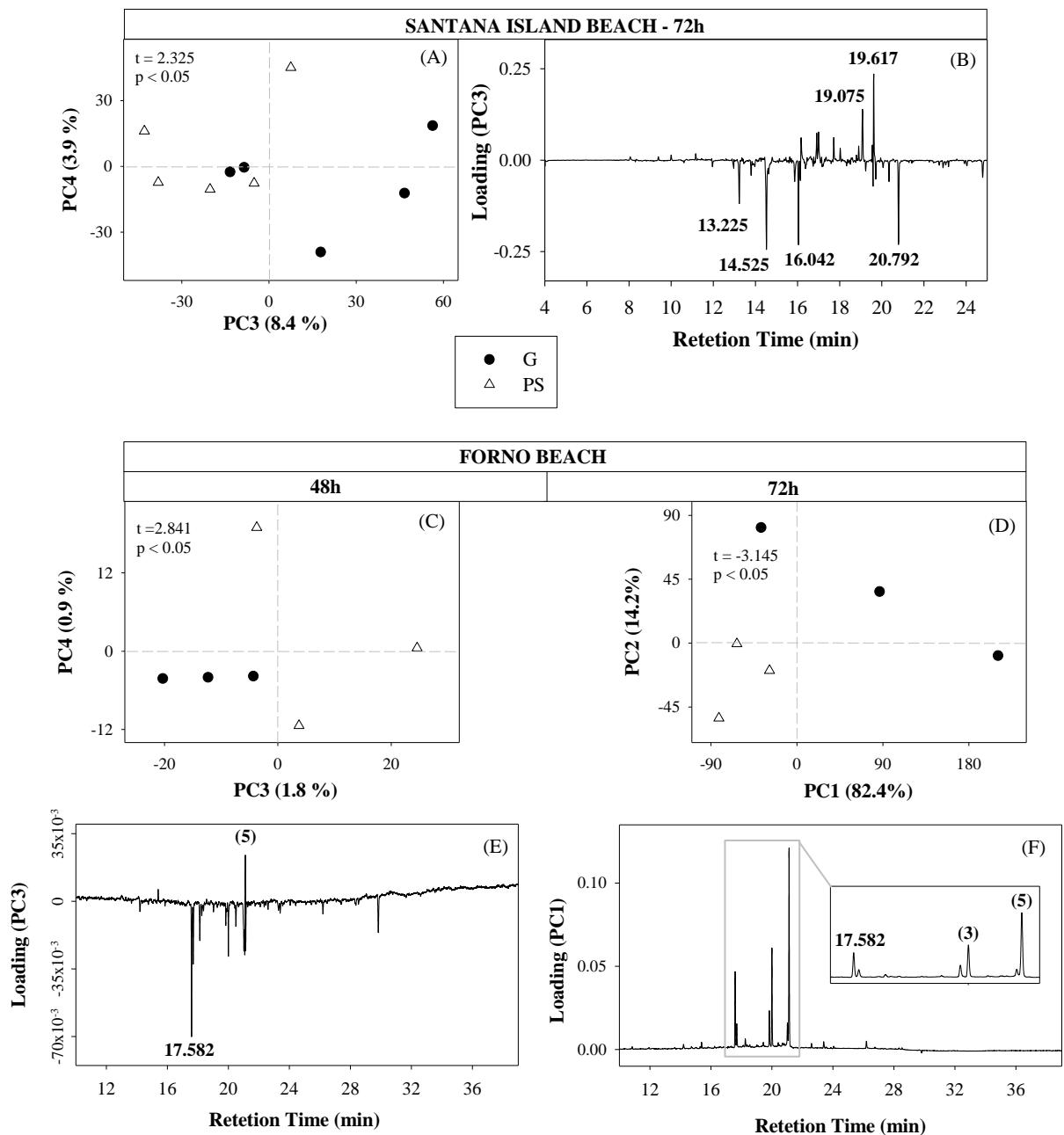
GC data analysed by PCA revealed the effect of direct grazing on metabolic variation after 48h, which was more accentuated after 72h of exposure to herbivore consumption. The period of 24h was not enough to observe a significant difference in chemical profile of SIMac and ForBuz submitted grazing (G) and pure seawater (PS) treatments. After 48 h, G individuals in the ForBuz population presented a significant discrimination of PS samples in PC3, which explained 1.8% of the data variation (Fig. 6C). After 72h, this discrimination became more pronounced, where PC1, which significantly discriminated individuals G and PS, explained 82.4% of the variation of the data (Fig. 6D). The same pattern was observed in grazing (G) on SIMac after 72h, where PC3, which explained 8.4% of the data variation, discriminated the G samples from PS (Fig. 6A).

The analysis of the loadings plot against the Retention Time (RT) revealed that the separation could be attributed to six main compounds in the SIMac population samples (Fig. 6B) and three ones in ForBuz (Figs 6E and 6F).

Of six main compounds of SIMac (samples tested for 72h) revealed by PCA, 4 were significantly up-regulated in PS samples ( $RT_{methodI}= 13.225$  min,  $RT_{methodI}= 14.525$  min,  $RT_{methodI}= 16.042$  min and  $RT_{methodI}= 20.792$  min) and 2 of them increased their concentration in samples from G treatment ( $RT_{methodI}= 19.075$  min and  $RT_{methodI}= 19.617$  min). The identity of these compounds could not be precisely determined. However, fragment pattern analysis

suggest that compounds at  $RT_{methodI} = 13.225$  min,  $RT_{methodI} = 16.042$  min (PS samples),  $RT_{methodI} = 19.075$  min and  $RT_{methodI} = 19.617$  min (G samples) are structurally related to halogenated sesquiterpenes by the loss of Cl ( $-35\text{ m/z}$ ), Br ( $-81\text{ m/z}$ ),  $H_2O$  ( $-18\text{ m/z}$ ) ions with isotopic intensities and separations characteristic of the presence of bromine and chlorine in the molecule, besides the presence of the propylene ion and the  $m/z$  77, 105 and 119 ions characteristic of aromatic hydrocarbons (YERMAKOV et al., 2010; TANI, 2013; RABE & DICKSCHAT, 2016;). The other main compounds present in the PS sample show fragmentation pattern with series of ions  $CH_3OCO$  ( $CH_2)_n$  ( $m/z$  73, 87, 101, 105,) characteristic of esters.

On the ForBuz samples that remained for 48h under direct herbivory exposure, it was observed two main compounds that vary most in the PCA; the G samples presented the highest concentration of the compound at  $RT_{methodII} = 17.582$  min, whereas in the PS samples the compound with up-regulated was the sesquiterpene obtusol (**5**) ( $RT_{methodII} = 21.111$  min). After 72h of grazing (G), it was observed an increase in the concentration of all chemicals of the profile, wherein the three majority up-regulated were in the main PCA, in descending order: the sesquiterpenes obtusol (**5**), (*E*) -10 15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3 (15), 7 (14) -triene (**3**) ( $RT_{methodII} = XX$ ) and the compound at  $RT_{methodII} = 17.582$  min. We suggest that the compound at  $TR = 17.582$  min, by its mass fragmentation profile, is also a halogenated sesquiterpene.



**Figure 6.** Metabolomic approach based on CG chemical profile of *L. dendroidea* exposed the experimental procedures G and PS. **(A)** Scatter plots of the scores of the Principal Component (PC<sub>3</sub> and PC<sub>4</sub>) of the *L. dendroidea* SIMac - 72h. **(B)** Loading graphs of the PC<sub>3</sub> against the retention time of the compounds of the SIMac samples - 72h. **(C)** Scatter plots of the scores of the PC<sub>3</sub> and PC<sub>4</sub> of the ForBuz samples of *L. dendroidea* - 48h. **(D)** Scatter plots of the scores of the PC<sub>1</sub> and PC<sub>2</sub> of the ForBuz samples - 72h. **(E)** Loading graphs of the PC<sub>3</sub> against the retention time of the compounds of the ForBuz samples - 48h. **(F)** Loading graphs of the PC<sub>1</sub> against the retention time of the compounds of the ForBuz samples - 72h. When G= grazer, NG= neighbor grazer, PG= presence of grazer and PS= pure seawater.

### *Effect of neighbor grazing (waterborne cues) and presence grazer*

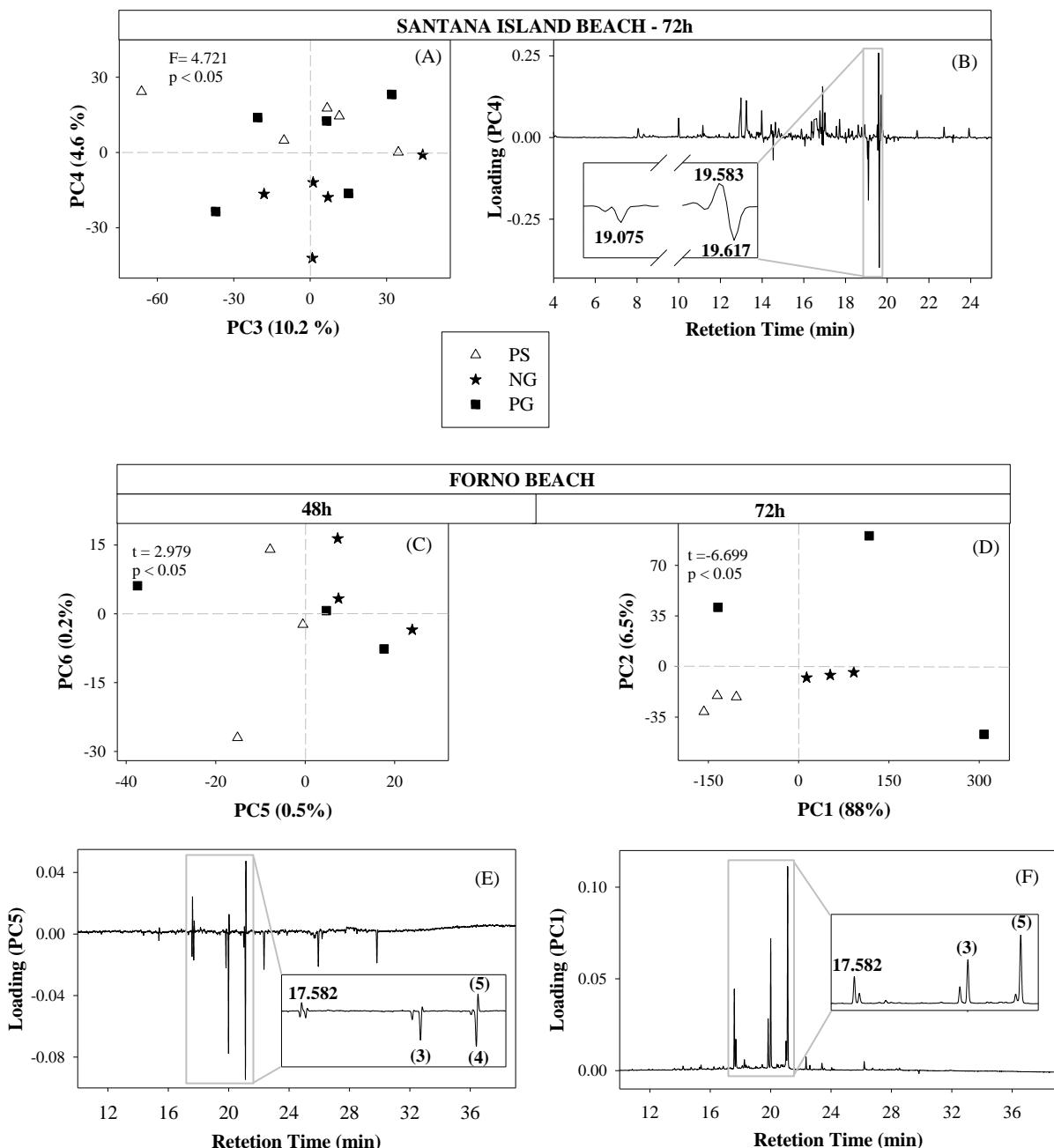
Analysis of GC data of SIMac and ForBuz samples from neighbor grazing (NG) using PCA followed the response pattern found in direct grazing (G). After 48h, algal samples from NG presented metabolic variation that became more pronounced after 72h (Fig. 7). After 24h, the seawater from grazed (G) *L. dendroidea* was not enough to induce significant difference between the samples of the two populations. After 48h, NG ForBuz sample presented a significant discrimination from PS samples in PC5 (Fig. 7C), which explained 0.5% of the data variation. After 72h this discrimination became more pronounced, where PC1, which significantly discriminated NG and PS samples, explained 88% of the variation of the data (Fig. 7D). The same pattern was observed in SIMac samples from G after 72h, where PC3, which explained 10.2% of the data variation, discriminated the NG samples from PS (Fig. 7A). The PG samples showed no difference in relation to PS and NG at any time tested in both populations.

The analysis of the loadings plot against the RT revealed that the separation could be attributed to three main compounds in the SIMac population samples (Fig 7B) and four in ForBuz (Fig 7E and 7F).

Among the three compounds of SIMac (samples tested for 72h) revealed by PCA, one of them was significantly up-regulated in PS samples ( $RT_{methodI} = 19.583$  min), while the other two increased their concentrations in samples NG ( $RT_{methodI} = 19.075$  min and  $RT_{methodI} = 19.617$  min). The compounds at  $RT_{methodI} = 19.075$  and  $RT_{methodI} = 19.617$  min were the same found in the G samples, showing the same pattern of variation in both UEs. It was not possible to identify the compound at  $RT_{methodI} = 19.583$  min, but analyzes of mass spectral fragmentation patterns allowed us to suggest that they are structurally related to halogenated sesquiterpenes. The compounds described for the NG samples at the 72h times were the same more up-regulated ones in the G samples, showing the same pattern of variation in both UEs.

On the ForBuz samples that remained 48h in direct herbivory (G) exposure, it was found four main compounds that vary most in the PCA. The NG samples presented the highest concentration of the compounds at  $RT_{method II} = 17.582$  min and obtusol (**5**) ( $TR_{method II} = 21.111$  min), whereas in the PS samples the compound that presented the highest concentration are (*E*) -10 15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3 (15), 7 (14) -triene (**3**) ( $TR_{method II} = 19.982$  min) and rogiolol ( $RT_{Method II} = 21.106$  min). After 72h of grazing (G), it was observed an increase in the concentration of all chemicals of the profile, wherein the

three major were in the main PCA, in descending order: sesquiterpenes obtusol (**5**), (*E*) -10-15-dibromo-9-hydroxy-chamigra-1,3 (15), 7 (14) -triene (**3**) and the compound at TR<sub>method II</sub> = 17.582 min. The compounds described for the NG samples at the 72h times were the same more up-regulated ones in the G samples, showing the same pattern of variation in both UEs.



**Figure 7.** Metabolomic approach based on chemical profile of *L. dendroidea* exposed the experimental unit NG, PG and PS by CG. **(A)** Scatter plots of the scores of the Principal Component PC<sub>3</sub> and PC<sub>4</sub> of the *L. dendroidea* SIMac samples - 72h. **(B)** Loading graphs of the PC<sub>4</sub> against the retention time of the compounds of the SIMac samples- 72h. **(C)** Scatter plots of the scores of the PC<sub>5</sub> and PC<sub>6</sub> of the *L. dendroidea* ForBuz samples - 48h. **(D)** Scatter

plots of the scores of the PC<sub>1</sub> and PC<sub>2</sub> of the ForBuz samples - 72h. (E) Loading graphs of the PC<sub>5</sub> against the retention time of the compounds of the ForBuz samples - 48h. (F) Loading graphs of the PC<sub>1</sub> against the retention time of the compounds of the ForBuz samples - 72h. When G= grazer, NG= neighbor grazer, PG= presence of grazer and PS= pure seawater.

## DISCUSSION

Our results revealed that grazing by the sea hare *A. brasiliiana* induce anti-herbivory chemical defenses in *L. dendroidea* after 48h of direct consumption, being more accentuated after 72h. This induced action was represented by significant changes in the sesquiterpene metabolic profile of this red seaweed. The same general pattern of induced response was found in the two populations of *L. dendroidea* studied, independent of herbivore origin, sympatric and allopathic.

The ability of seaweeds to induce defenses in response to attack by herbivores is known to date mainly in brown, but less in red and green seaweeds (TOTH & PAVIA 2007). However, it was also verified that clones of *L. dendroidea* produced higher concentrations of elatol up to 2 days after treatment of simulated herbivory (SUDATTI et al. submitted). Then, *L. dendroidea* may added to short list of red seaweeds known to induce resistance by direct grazing (e.g. WEIDNER et al. 2004; CEH et al. 2005; ROTHAEUSLER et al., 2005; DIAZ et al., 2006; ROHDE et al. 2008a; NYLUND et al. 2011). Also, our results reinforce the evidences that inducible chemical defences among seaweeds are not restricted to brown ones, but it may be more common than imagined until very recently.

Besides direct action of grazers, chemicals released by grazed neighbors can provide a reliable - and earlier - hint to induce defenses (RHOADES 1983). Here, we verified that *L. dendroidea* perceive chemical waterborne signal from grazed conspecific neighbors after 48h, but in a more accentuated mode after 72h. Several studies in the marine environment have failed to report waterborne signal as triggers for induced resistance in brown (SOTKA et al. 2002; HEMMI et al. 2004; MOLIS et al. 2006; YUN et al. 2007; ROHDE & WAHL 2008A; FLÖTHE et al. 2014), green (WEIDENER et al. 2004; TOTH 2007) and red seaweeds (TOTH 2007; YUN et al. 2007; ROHDE & WAHL 2008a). However, the present study corroborate few previous evidences of induced defense responses to waterborne signal released by grazed neighbors in seaweeds (brown algae: TOTH & PAVIA 2000; ROHDE et al. 2004; MACAYA et al. 2005; TOTH 2007; YUN et al. 2007, 2012; green algae: DIAZ et al. 2006; TOTH 2007

and red algae: TOTH 2007). However, our findings are among the first reports of inducible defence by waterborne signal in red seaweeds.

The time scale of the experiments is probably a crucial aspect for the detection of induced chemical responses, because activation of biosynthetic pathways that lead to production of herbivore-deterrant secondary metabolites may vary in scales of hours or days (TOTH & PAVIA 2007). In *L. dendroidea*, as in most other seaweeds, nothing is known about the lag time of induced responses, i.e. the time interval from the action of grazing to the deployment of an effective defense. In most studies, an induction period of at least 14 days was allowed before the first evidence of induction (e.g. PAVIA & TOTH 2000; BORELL *et al.* 2004; WEIDNER *et al.* 2004; CEH *et al.* 2005; MACAYA *et al.* 2005; ROTHAESUSLER *et al.* 2005; TOTH *et al.* 2005; MOLIS *et al.* 2006, 2008; COLEMAN *et al.* 2007B; ROHDE & WAHL 2008B; YUN *et al.* 2007, 2012), but other few studies demonstrated a induced resistance within 2 and 10 days (HEMMI *et al.* 2004; TOTH 2007; FLÖTHE & MOLIS 2013) or more than 20 days (TOTH & PAVIA 2000; TAYLOR *et al.* 2002; YUN *et al.* 2010; FLÖTHE *et al.* 2014). In fact, as recently observed for *L. dendroidea* (Sudatti *et al.* in press), fast induction would seem a more reasonable defensive strategy than 11-20 day after damage or herbivory action frequently reported for brown seaweeds (PAVIA & TOTH 2007). In addition, to be effective against herbivory, defense induction should be rapid and also quickly scaled back if no further attack is imminent (HAMMERSTROM *et al.* 1998).

Generally, it remains unclear on which basis this induction period was chosen in the several studies to measure the induced action. Therefore, the time scale of induction in laboratory experiments must be carefully considered because it may not be ecologically realistic to forcing the herbivores to continue feeding on the plants even if they induce responses that would result in decreased herbivore pressure in short-term experiments or in a more natural field condition (TOTH & PAVIA 2007). However, the response speed is proportional to grazing intensity or a critical amount of tissue that must be lost before induction occurs or the amount of cue received (LONG *et al.* 2007). *Aplysia brasiliana* can inflict a substantial loss of biomass in a short time, and this action may induce a fast induced response in *L. dendroidea*. The response speed is an essential feature in the interaction between prey and grazer, because the deployment of chemical defenses may incur costs and may enhance the risk of detection (TOTH & PAVIA 2007).

Studies on seaweed metabolites responsible for induced resistance have focused mainly on phlorotannins (TOTH & PAVIA 2007; JORMALAINEN & HONKANEN 2008), though induction of these chemicals does not exclusively explain induced resistance in these organisms (STEINBERG 1994; PAVIA & TOTH 2000; HEMMI *et al.* 2004; LONG *et al.* 2007). Such variable results emphasize the need for further studies with other metabolic approaches in relation to metabolites for induced resistance in seaweeds, since only few studies have characterized other metabolic besides phlorotannins as induced defense in seaweeds (e.g. CRONIN & HAY 1996; NYLUND *et al.* 2011; SUDATTI *et al.* submitted). In our GC analysis monitoring induced defense in *L. dendroidea*, we observed the up-regulation of halogenated sesquiterpenes as most pronounced metabolic changes. We can also emphasize that grazing and ungrazed neighbor conspecific presented similar changes in the metabolic profile after 72h in both populations of *L. dendroidea* assayed. As all morphological and nutritional characteristics in the seaweed in palatability assays were eliminated in the artificial foods, since it was used only crude extracts, we can affirm that the deterrence found was caused by changes in sesquiterpenoidic components.

Despite the known high variability and diversity of sesquiterpenes in species of *Laurencia* (e.g. MACHADO *et al.* 2016) and also reported in our results with *L. dendroidea*, the inductive responses of this seaweed to feeding by *A. brasiliiana* demonstrated in this study showed is consistent and similar for both populations studied, independent of the variation in the secondary metabolites chemical profile. This qualitative and quantitative variability found in the secondary metabolism of this species can be related to response to heterogeneities of environmental conditions or intrapopulation genetic variation and could represent a strategy for avoiding some grazers while at the same time attracting others that may eliminate parasites or competitors (HAY & FENICAL 1996; PAUL & VAN ALSTYNE 1992).

Direct grazing by *A. brasiliiana* on or chemical signal released by grazed *L. dendroidea* increased the sesquiterpene content in laboratory assays. Induced defense eliminates the need to maintain high levels of very deterrent and biologically active substances which may be extremely toxic to the herbivore, influencing feeding preferences, interspecific competitions and/or performance which may reflect on an ecological imbalance (TOTH *et al.* 2005; LONG *et al.* 2007; YUN *et al.*, 2010; HAAVISTO *et al.* 2016) as well be toxic to the plants. Thus, the risk of autotoxicity is minimized because the more toxic metabolite is not maintained at high levels in the organism's tissues (WAR *et al.* 2012). Many halogenated secondary metabolites of *Laurencia*, due to their toxicity, are biosynthesized and

stored in refractive membrane-bound vesicles (*corps en cerise*) and also in vesicles distributed along the cytoplasm and within the chloroplasts (SALGADO *et al.* 2008) and through a transport system by membranous tubular connections these metabolites reach the surface (SUDATTI *et al.* 2008). The main disadvantage of a direct induced defense is that tissue must be lost in order for the defense to be effective (WAR *et al.* 2012). And also emitted signals become public information that may be used the herbivore itself as chemical cues for the location of its host algae, as we have already described the action of the sesquiterpene elatol to attract *A. brasiliiana* to the algae *L. dendroidea* (NOCCHI *et al.* 2017). Therefore, it is expected that elatol is not a more important metabolite compared to other sesquiterpenes that have increased their concentration in the response of induction of chemical defenses of *L. dendroidea* by direct or indirect action of *A. brasiliiana*. Therefore, even being the major substance in one of the populations studied, it was not one of the major metabolites that had its increased concentration in the response of induction of chemical defenses by direct or indirect action of *A. brasiliiana*.

Despite consistent evidence of induction by waterborne cues demonstrated in this study, we do not exclude other possible explanations for the results found. Our experiment addressed limitations, the applied flow from the upstream to the downstream compartment was relatively low ( $0.12 \text{ L.h}^{-1}$ ) and potentially exposing the seaweeds to higher concentrations of any putative inducing metabolite than in the natural environment, which could have maximized our chances of finding an effect generated by grazed neighbors. However, *L. dendroidea* may form dense, sometimes monospecific stands in field where individuals are closely in physical contact (GUIRY, 2017), therefore, the risk that herbivores switch between neighboring conspecifics is high and this would favor the evolution of a communication between seaweed anticipating the strong grazing pressure characteristic of marine benthic communities, and therefore inducing defenses before incurring damage (CRONIN & HAY, 1996). Although this phenomenon is subject of debate because of the fact that there can be no selective advantage to plants that warn their neighbors of imminent danger, neighboring seaweeds are likely to compete for resources. Helping adjacent seaweeds may shift the competitive balance between emitter and receiver towards a disadvantage for the emitter, which already received damage but possibly helps its competitor to successfully escape herbivore attack. This could result in stronger effects on herbivore population size and increased prevention of future grazing damage than can be anticipated helping to maintain the species (CAMPOS *et al.*, 2008).

Our results, as well as from few other studies (VAN ALATYNE 1988; TOTH & PAVIA 2000; ROHDE *et al.* 2004), have shown that waterborne cues from mere grazer presence were a deficient signal to induce defense different from clear induction responses from algae nearby grazing. These evidences suggests that waterborne cues induction is restricted to herbivore grazing, and the presence of digestive enzymes in secretions produced by herbivores feed may be the most plausible explanation for the lack of induction. Many gastropods secrete salivary amylase and other carbohydrases when graze, and saliva released into the oral mucus induces defense in algae nearby grazing (COLEMAN *et al.* 2007a). Sea hare such *Aplysia* are no exception, since  $\alpha$ -amylases and  $\alpha$ -glucosidases were purified from the *A. kurodai* (TSUJI *et al.* 2014). Amylase may be present in oral mucus secreted by *A. brasiliiana* while grazing, signaling a possible potential grazing threat to the o neighboring *L. dendroidea* undamaged.

We have shown that *L. dendroidea* has evolved a mechanism to sense and respond to the presence of actively feeding by *A. brasiliiana* and through waterborne cues in the laboratory, although we do not presently know the exact origin of the cue (chemical signals released by the algae while it is grazed or substances present in the mouth of the herbivore) that elicited the induced response. This mechanism may be important for both undamaged seaweed individuals growing close to attacked conspecific and for attacked individuals eliciting induced systemic defenses to minimize further herbivory. However, rigorous experimental field investigations are needed to reveal whether this mechanism is present also in knotted wrack individuals in natural populations and to determine clearly the mechanisms and stimuli responsible for induction in seaweeds. So it will be possible produce a more complete picture of the induction of defenses in seaweed, and an investigation of their variability as a consequence of intrinsic (physiology, life history stages, genetics, identification the chemical structure of the info-chemicals involved in waterborne induction and in the direct induction) or extrinsic causes (environmental conditions, inducing agents such as predators) and of the ecological implications of this variability on community structure and functioning. In the present study, we start this endeavor by multiple focus giving new insights about induced anti-herbivory resistances and/or the metabolic changes by direct grazing and waterborne cues released from grazed macroalgae and from presence of grazer; and the influence of the geographic variability and sympatric and allopathic herbivores in the pattern of induced response in the red alga *L. dendroidea*. The use of a metabolomics

approach enabled a straightforward detection of defense metabolite in algae defense induction studies.

## REFERENCES

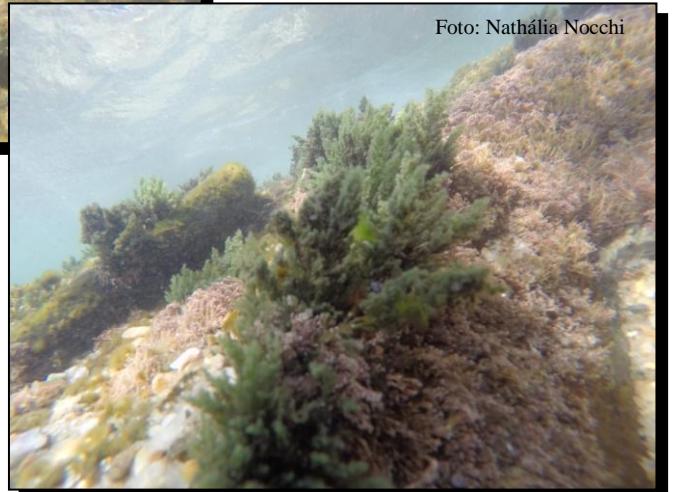
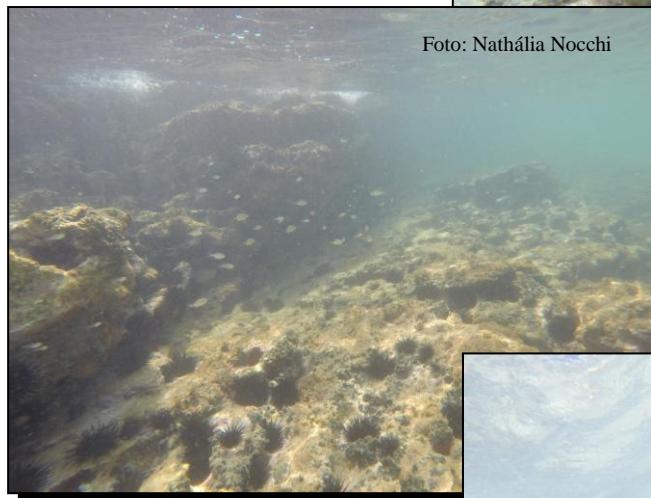
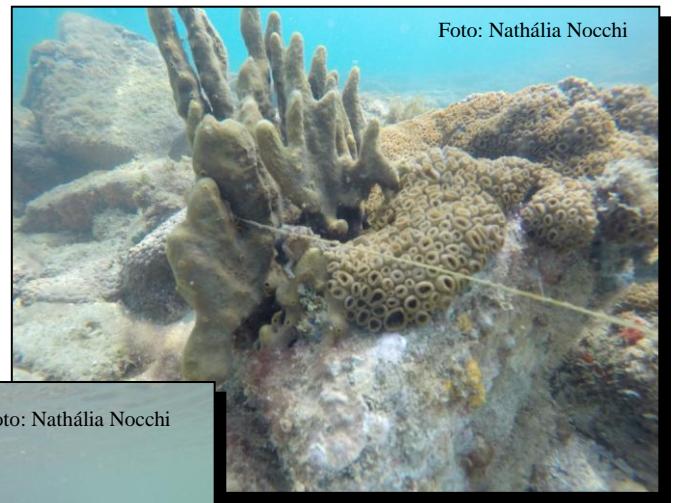
- ARGANDOÑA, V. H.; SAN-MARTÍN, A.; ROVIROSA, J. **1993**. Halogenated sesquiterpenes pacifenol and pacifenol derivatives on the aphid *Schizaphis graminum*. *Phytochemistry*, 32: 1159-1161.
- BORELL, E. M.; FOGGO, A.; COLEMAN, R. A. **2004**. Induced resistance in intertidal macroalgae modifies feeding behaviour of herbivorous snails. *Oecologia*, 140: 328-334.
- CAMPOS, W. G.; FARIA, A. P.; OLIVEIRA, M. G. A.; SANTOS, H. L. **2008**. Induced response against herbivory by chemical information transfer between plants. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 20: 257-266.
- CEH, J.; MOLIS, M.; DZEHA, T. M.; WAHL, M. **2005**. Induction and reduction of anti-herbivore defenses in brown and red macroalgae off the Kenyan coast. *Journal of Phycology*, 41: 726-731.
- COLEMAN, R. A., RAMCHUNDER, S. J., MOODY, A. J., & FOGGO, A. **2007a**. An enzyme in snail saliva induces herbivore-resistance in a marine alga. *Functional Ecology*, 21: 101-106.
- COLEMAN, R. A.; RAMCHUNDER, S. J.; DAVIES, K. M.; MOODY, A. J.; FOGGO, A. **2007b**. Herbivore-induced infochemicals influence foraging behaviour in two intertidal predators. *Oecologia*, 151: 454-463.
- CRONIN, G. **2001**. Resource Allocation in seaweeds and marine invertebrates: Chemical defense patterns in relation to defense theories. In: MCCLINTOCK, J.; BAKER, B. (Eds.). **Marine Chemical Ecology**. CRC Press. p. 325-353.
- CRONIN, G.; HAY, M. E. **1996**. Induction of seaweed chemical defenses by amphipod grazing. *Ecology*, 77: 2287-2301.
- DA GAMA, B. A., PEREIRA, R. C., CARVALHO, A. G., COUTINHO, R., & YONESHIGUE-VALENTIN, Y. **2002**. The effects of seaweed secondary metabolites on biofouling. *Biofouling*, 18: 13-20.
- DÍAZ, E.; GÜLDENZOPH, C.; MOLIS, M.; MCQUAID, C.; WAHL, M. **2006**. Variability in grazer-mediated defensive responses of green and red macroalgae on the south coast of South Africa. *Marine Biology*, 149: 1301-1311.
- FLÖTHE, C. R.; JOHN, U.; MOLIS, M. **2014**. Comparing the relative importance of water-borne cues and direct grazing for the induction of defenses in the brown seaweed *Fucus vesiculosus*. *PLoS ONE*, 9: e109247.
- FLÖTHE, C. R.; MOLIS, M. **2013**. Temporal dynamics of inducible anti-herbivory defenses in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae). *Journal of Phycology*, 49: 468-474.
- FLÖTHE, C. R.; MOLIS, M.; JOHN, U. **2014**. Induced resistance to periwinkle grazing in the brown seaweed *Fucus vesiculosus* (Phaeophyceae): molecular insights and seaweed-mediated effects on herbivore interactions. *Journal of Phycology*, 50: 564-576.

- GRANADO, I.; CABALLERO, P. **1995.** Chemical defense in the seaweed *Laurencia obtusa* (Hudson) Lamouroux. *Scientia Marina*, 59: 31-39.
- HAAVISTO, F.; VÄLIKANGAS, T.; JORMALAINEN, V. **2010.** Induced resistance in a brown alga: phlorotannins, genotypic variation and fitness costs for the crustacean herbivore. *Oecologia*, 162: 685-695.
- HARIZANI, M.; IOANNOU, E.; ROUSSIS, V. **2016.** The *Laurencia* paradox: An endless source of chemodiversity. In: KINGHORN, A. D. et al. (Eds.). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Cham: Springer International Publishing, 102p. 91-252.
- HAY, M. E.; FENICAL, W. **1996.** Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea. *Oceanography*, 9: 10-20.
- HAY, M. E.; FENICAL, W.; GUSTAFSON, K. **1987.** Chemical Defense against diverse coral-reef herbivores. *Ecology*, 68: 1581-1591.
- HAY, M. E.; RENAUD, P. E.; FENICAL, W. **1992.** Large mobile *versus* small sedentary herbivores and their resistance to seaweed chemical defenses. *Oecologia*, 75: 246-252.
- HAY, M. E.; STACHOWICZ, J. J.; CRUZ-RIVERA, E.; BULLARD, S.; DEAL, M. S.; LINDQUIST, N. **1998.** Bioassays with marine and freshwater organisms. In: HAYNES, K. F; MILLAR, J. R. (eds) *Methods in chemical ecology bioassays*. Chapman and Hall, New York, p. 39-141
- HAMMERSTROM, K.; DETHIER, M. N.; DUGGINS, D. O. **1998.** Rapid phlorotannin induction and relaxation in five Washington kelps. *Marine Ecology Progress Series*, 193: 293-305.
- HEMMI, A.; HONKANEN, T.; JORMALAINEN, V. **2004.** Inducible resistance to herbivory in *Fucus vesiculosus* duration, spreading and variation with nutrient availability. *Marine Ecology Progress Series*, 273: 109-120.
- JORMALAINEN, V., HONKANEN, T. **2008.** Macroalgal chemical defenses and their roles in structuring temperate marine communities. In: *Algal chemical ecology*. Springer Berlin Heidelberg: 57-89.
- KARBAN, R. **2011.** The ecology and evolution of induced resistance against herbivores: Induced resistance against herbivores. *Functional Ecology*, 25: 339-347.
- LOCKWOOD III, J. R. **1998.** On the statistical analysis of multiple-choice feeding preference experiments. *Oecologia*, 116: 475-481.
- LONG, J. D.; HAMILTON, R. S.; MITCHELL, J. L. **2007.** Asymmetric competition via induced resistance: specialist herbivores indirectly suppress generalist preference and populations. *Ecology*, 88: 1232-1240.
- MACAYA, E. C.; ROTHÄUSLER, E.; THIEL, M.; MOLIS, M.; WAHL, M. **2005.** Induction of defenses and within-alga variation of palatability in two brown algae from the northern-central coast of Chile: Effects of mesograzers and UV radiation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 325: 214-227.
- MACHADO, F. L., DUARTE, H. M., GESTINARI, L., CASSANO, V., KAISER, C. R., & SOARES, A. R. **2016.** Geographic Distribution of Natural Products Produced by Red Algae *Laurencia dendroidea* J. Agardh. *Chemistry & Biodiversity*, 13: 845-851.

- MACHADO, F. D. S., KAISER, C. R., COSTA, S. S., GESTINARI, L. M., & SOARES, A. R. **2010**. Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20: 441-452.
- MOLIS, M.; KÖRNER, J.; KO, Y. W.; KIM, J. H.; WAHL, M. **2006**. Inducible responses in the brown seaweed *Ecklonia cava*: the role of grazer identity and season. *Journal of Ecology*, 94: 243-249.
- MOLIS, M.; KÖRNER, J.; KO, Y. W.; KIM, J. H. **2008**. Specificity of inducible seaweed anti-herbivory defences depends on identity of macroalgae and herbivores. *Marine Ecology Progress Series*, 354: 97-105.
- NADEAU, L.; PAIGE, J. A.; STARCZAK, V.; CAPO, T., LAFLER, J.; BIDWELL, J. P. **1989**. Metamorphic competence in *Aplysia californica* Cooper. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 131: 171-193.
- NOCCHI, N, SOARES, A.R., SOUTO, M.L., FERNÁNDEZ, J.J., MARTIN, M.N. PEREIRA, R.C. 2017. Detection of a chemical cue from the host seaweed *Laurencia dendroidea* by the associated mollusc *Aplysia brasiliiana*. *PlosOne* 12: e0187126.
- NYLUND, G. M.; WEINBERGER, F.; REMPT, M.; POHNERT, G. **2011**. Metabolomic Assessment of Induced and Activated Chemical Defence in the Invasive Red Alga *Gracilaria vermiculophylla*. *PLoS ONE*, 6: e29359.
- PAUL, V. J.; VAN ALSTYNE, K. L. **1992**. Activation of chemical defenses in the tropical green algae *Halimeda* spp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 160: 191-203.
- PAVIA, H.; TOTH, G. B. **2000**. Inducible chemical resistance to herbivory in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Ecology*, 81: 3212-3225.
- PAWLIK, J. R. **1989**. Larvae of the sea hare *Aplysia californica* settle and metamorphose on an assortment of macroalgal species. *Marine ecology progress series*, 51: 195-199.
- PENNINGS, S. C. **1990**. Size-related shifts in herbivory: specialization in the sea hare *Aplysia californica* Cooper. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 142: 43-61.
- PEREIRA, R.; ANDRADE, P.; VALENTÃO, P. **2016**. Chemical diversity and biological properties of secondary metabolites from sea hares of *Aplysia* genus. *Marine Drugs*, 14: 39.
- PEREIRA, R. C.; COSTA, E. S.; SUDATTI, D. B.; DA GAMA, B. A. P. **2017**. Inducible defenses against herbivory and fouling in seaweeds. *Journal of Sea Research*, 122: 25-33.
- PEREIRA, R.C.; DA GAMA B.A.P. **2008**. Macroalgal chemical defenses and their roles in structuring tropical marine communities. In: AMSLER, C.D (Ed). *Algal Chemica Ecology*. Springer, Berlin, 25-55.
- PEREIRA, R. C.; DA GAMA, B. A. P.; TEIXEIRA, V. L.; YONESHIGUE-VALENTIN, Y. **2003**. Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. *Brazilian Journal of Biology*, 63: 665-672.
- RABE, P.; DICKSCHAT, J. S. **2016**. The EIMS fragmentation mechanisms of the sesquiterpenes corvol ethers A and B, *epi*-cubebol and isodauc-8-en-11-ol. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12: 1380-1394.

- RHOADES, D. F. **1983**. Responses of alder and willow to attack by tent caterpillars and webworms: Evidence for pheromonal sensitivity of willows. In: HEDIN, P. A. (Ed.). *Plant Resistance to Insects*. Washington D.C. American Chemical Society, 208: 55-68.
- ROHDE, S.; MOLIS, M.; WAHL, M. **2004**. Regulation of anti-herbivore defence by *Fucus vesiculosus* in response to various cues. *Journal of Ecology*, 92: 1011-1018.
- ROHDE, S.; WAHL, M. **2008a**. Antifeeding defense in Baltic macroalgae: induction by direct grazing versus waterborne cues. *Journal of Phycology*, 44: 85-90.
- ROHDE, S.; WAHL, M. **2008b**. Temporal dynamics of induced resistance in a marine macroalga: Time lag of induction and reduction in *Fucus vesiculosus*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 367: 227-229.
- ROTHAEUSLER, E.; MACAYA, E. C.; MOLIS, M.; WAHL, M.; THIEL, M. **2005**. Laboratory experiments examining inducible defense show variable responses of temperate brown and red macroalgae. *Revista Chilena de Historia Natural*, 78: 603-614.
- SALGADO, L. T.; VIANA, N. B.; ANDRADE, L. R.; LEAL, R. N.; DA GAMA, B. A. P.; ATTIAS, M.; PEREIRA, R. C.; AMADO FILHO, G. M. **2008**. Intra-cellular storage, transport and exocytosis of halogenated compounds in marine red alga *Laurencia obtusa*. *Journal of Structural Biology*, 162: 345-355.
- SOTKA, E. E.; TAYLOR, R. B.; HAY, M. E. **2002**. Tissue-specific induction of resistance to herbivores in a brown seaweed: the importance of direct grazing versus waterborne signals from grazed neighbors. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 277: 1-12.
- STEINBERG, P. D. **1994**. Lack of short-term induction of phlorotannins in the Australasian brown algae *Ecklonia radiata* and *Sargassum vestitum*. *Marine Ecology Progress Series*, 112: 129-133.
- SUDATTI, D. B.; RODRIGUES, S. V.; COUTINHO, R.; DA GAMA, B. A.; SALGADO, L. T.; AMADO FILHO, G. M.; PEREIRA, R. C. **2008**. Transport and defensive role of elatol at the surface of the red seaweed *Laurencia obtusa* (Ceramiales, Rhodophyta). *Journal of Phycology*, 44: 584-591.
- SUDATTI, D.B.; FUJII, M.T.; RODRIGUES, S.V.; TURRA, T. & PEREIRA, R.C. *In press*. Prompt induction of chemical defenses in the red seaweed *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales: Rhodophyta): the role of herbivory and epibiosis. *Journal of Sea Research*.
- TANI, A. **2013**. Fragmentation and reaction rate constants of terpenoids determined by proton transfer reaction-mass spectrometry. *Environmental Control in Biology*, 51: 23-29.
- TAYLOR, R. B.; SOTKA, E.; HAY, M. E. **2002**. Tissue-specific induction of herbivore resistance: seaweed response to amphipod grazing. *Oecologia*, 132: 68-76.
- TOTH, G. B. **2007**. Screening for induced herbivore resistance in PSedish intertidal seaweeds. *Marine Biology*, 151: 1597-1604.
- TOTH, G. B.; LANGHAMER, O.; PAVIA, H. **2005**. Inducible and constitutive defenses of valuable seaweed tissues: consequences for herbivore fitness. *Ecology*, 86: 612-618.
- TOTH, G. B.; PAVIA, H. **2000**. Water-borne cues induce chemical defense in a marine alga (*Ascophyllum nodosum*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 14418-14420.

- TOTH, G. B.; PAVIA, H. **2007**. Induced herbivore resistance in seaweeds: a meta-analysis. *Journal of Ecology*, 95: 425-434.
- TSUJI, A.; NISHIYAMA, N.; OHSHIMA, M.; MANIWA, S.; KUWAMURA, S.; SHIRAISHI, M.; YUASA, K. **2014**. Comprehensive enzymatic analysis of the amylolytic system in the digestive fluid of the sea hare, *Aplysia kurodai*: Unique properties of two  $\alpha$ -amylases and two  $\alpha$ -glucosidases. *FEBS Open Bio*, 4: 560-570.
- VAN ALSTYNE, K. L. **1988**. Herbivore grazing increases polyphenolic defenses in the intertidal brown alga *Fucus Distichus*. *Ecology*, 69: 655-663.
- WAR, A. R.; PAULRAJ, M. G.; AHMAD, T.; BUHROO, A. A.; HUSSAIN, B.; IGNACIMUTHU, S.; SHARMA, H. C. **2012**. Mechanisms of plant defense against insect herbivores. *Plant Signaling & Behavior*, 7: 1306-1320.
- WEHRENS, R. **2011**. *Chemometrics with R: multivariate data analysis in the natural sciences and life sciences*. Berlin: Springer.
- WEIDNER, K.; LAGES, B. G.; DA GAMA, B. A.; MOLIS, M.; WAHL, M.; PEREIRA, R. C. **2004**. Effects of mesograzers and nutrient levels on the induction of defenses in several Brazilian macroalgae. *Marine ecology Progress Series*, 283: 113-125.
- YERMAKOV, A. I.; KHЛАIFAT, A. L.; QUTOB, H.; ABRAMOVICH, R. A.; KHOMYAKOV, Y. Y. **2010**. Characteristics of the GC-MS mass spectra of terpenoids ( $C_{10}H_{16}$ ). *Chemical Sciences Journal*, 2010: CSJ-7.
- YATES JL; PECKOL P. **1993**. Effects of nutrient availability and herbivory on polyphenolics in the seaweed *Fucus vesiculosus*. *Ecology*, 74:1757-1766
- YUN, H. Y.; ROHDE, S.; LINNANE, K.; WAHL, M.; MOLIS, M. **2010**. Seaweed-mediated indirect interaction between two species of meso-herbivores. *Marine Ecology Progress Series*, 408: 47-53.
- YUN, H. Y.; CRUZ, J.; TREITSCHKE, M.; WAHL, M.; MOLIS, M. **2007**. Testing for the induction of anti-herbivory defences in four Portuguese macroalgae by direct and water-borne cues of grazing amphipods. *Helgoland Marine Research*, 61: 203-209.
- YUN, H. Y.; ENGELEN, A. H.; SANTOS, R. O.; MOLIS, M. **2012**. Water-borne cues of a non-indigenous seaweed mediate grazer-deterrant responses in native seaweeds, but not vice versa. *PLoS ONE*, 7: e38804.



## CAPÍTULO V

---

### Considerações Finais

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sinalização química constitui grande parte da linguagem da vida no mar. Os infoquímicos estão envolvidos em níveis fundamentais e vitais, desde processos reprodutivos, assentamento larval, busca de hospedeiros; alelopáticas e interações tróficas. Estas substâncias exsudadas na água afetam não apenas o comportamento individual e os processos em nível populacional, mas também a organização comunitária e a funcionamento do ecossistema. A compreensão das interações bióticas e seus efeitos nos ecossistemas marinhos avançarão mais rapidamente se esta linguagem de comunicação for estudada e compreendida.

Neste contexto, essa tese apresentou uma contribuição para o debate no campo da sinalização química no ambiente marinho, principalmente na área envolvendo estudos de comunicação herbívooro-planta e planta-planta, onde as informações ainda são escassas e controversas. Assim, o objetivo geral foi investigar a presença de pistas químicas envolvidas nas interações ecológicas entre a macroalga *Laurencia dendroidea* e o seu herbívooro associado, o molusco *Aplysia brasiliiana* (modelo bem conhecido de herbívooro-planta no ambiente marinho), abordando o metabolismo secundário da alga como veículo de transferência de informações. Para isso, foram avaliadas duas vertentes na interação entre esses dois organismos, primeiro se *A. brasiliiana* reconhece e responde aos metabólitos de *L. dendroidea* exsudados na água do mar; e segundo, como *L. dendroidea* responde à herbivoria por *A. brasiliiana*, avaliando a indução de resistências anti-herbivoria e as alterações metabólicas em macroalgas consumidas e aquelas ilesas expostas a pistas químicas de alarme transmitidas pela água. Em ambos os casos, um estudo químico das substâncias envolvidas nas respostas foi abordado. Para determinação das substâncias de *L. dendroidea* envolvidas nos processos de comunicação, inicialmente foi realizado um estudo fitoquímico para o isolamento e a caracterização das substâncias produzidas por esta macroalga, e que posteriormente foram usadas como substâncias de referência para caracterização dos metabólitos envolvidos nos processos ecológicos estudados. Foi possível isolar e caracterizar 9 sequiterpenos do tipo chamigrano, estruturalmente correlacionados: (+)-etatol, 10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno, (Z)-10,15-dibromo-9-hydroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno, (E)-10,15-dibromo-9-hydroxi-chamigra-1,3(15),7(14)-trieno, isoobtusol, obtusol, obtusano, nifediceno e 3,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno.

A principal hipótese que permeou todo esse trabalho foi baseada na existência de uma estreita comunicação entre *L. dendroidea* e *A. brasiliiana*, mediada por substâncias exsudadas

na água, no que diz respeito a localização da macroalga pelo herbíboro e a comunicação intraespecífica entre indivíduos de *L. dendroidea* mediante a atividade desse herbíboro. A partir de experimentos em laboratório, somados à técnicas de química analítica e uma abordagem metabolômica, foi possível observar que *A. brasiliiana* foi capaz de detectar e responder a metabólitos produzidos e exsudados por *L. dendroidea*. Este gastrópode tem quimiotaxia positiva por *L. dendroidea* viva, seus exsudatos na água condicionada, seus extratos brutos tanto da planta quanto da água condicionada e pelo o sesquiterpeno (+)-elatol, metabólito majoritário da população estudada (Praia Azeda – Armação dos Búzios, RJ) e o principal exsudado da água descrito neste trabalho. E por sua vez, *L. dendroidea* respondeu ao consumo pela lebre do mar *A. brasiliiana*, onde 48h depois foi possível induzir resistência à herbivoria em indivíduos de *L. dendroidea* consumidos diretamente e em espécimes intactos desta macroalga e que receberam pistas químicas de vizinhos danificados; esta resposta tornou-se mais acentuada e consistente após 72h. A presença do herbíboro sozinho não foi capaz de induzir nenhuma resposta em *L. dendroidea*. O aumento na resistência contra a herbivoria foi acompanhado por uma mudança significativa no perfil metabólico de sesquiterpenos. O mesmo padrão geral de resposta induzida foi encontrado nas duas populações de *L. dendroidea* estudadas (Praia do Forno em Armação dos Búzios, RJ e Ilha de Santana em Macaé, RJ) e foi independente da origem do herbíboro (simpátrico e alopátrico).

Este estudo confirmou a importância da sinalização química nas interações entre os organismos marinhos e das metodologias e abordagens metabólicas que permitem o acesso e a identificação de algumas substâncias-chaves nas interações mediadas por sinalização química, abordando a associação *Laurencia-Aplysia*. Foi demonstrado, pela primeira vez, uma das substâncias responsáveis pela atração de *Aplysia* para sua macroalga hospedeira *Laurencia*, porque mesmo havendo um consenso de que espécies do gênero *Aplysia* se alimentam de macroalgas vermelhas, as pistas químicas responsáveis pela atração deste herbíboro para a macroalga não havia sido identificada. A atração para macroalga hospedeira, a rápida taxa de crescimento e alimentação, onde um indivíduo adulto de *Aplysia* pode consumir uma elevada biomassa de alga por dia, esgotando rapidamente o seu estoque alimentar local e forçando a sua migração para outros hospedeiros, a indução da resistência anti-herbivoria gerada pelo aumento da concentração de sesquiterpenos em indivíduos de *L. dendroidea* não danificados, em resposta a pistas químicas de alarme exsudadas por coespecíficos predados por *A. brasiliiana* pode ser um dos principais responsáveis pelo não esgotamento do banco de macroalgas associados a este herbíboro específico. Assim, podemos propor que as pistas

químicas envolvidas na relação herbívoro-planta, principalmente em relação na busca e atração do herbívoro específico *A. brasiliensis* para a macroalga hospedeira *L. dendroidea* e a resposta dessa macroalga à herbívoria, têm elevada importância na dinâmica espacial e temporal das populações e na manutenção evolutiva da coexistência desses dois táxons.

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

# APÊNDICE

## Caderno de Espectros

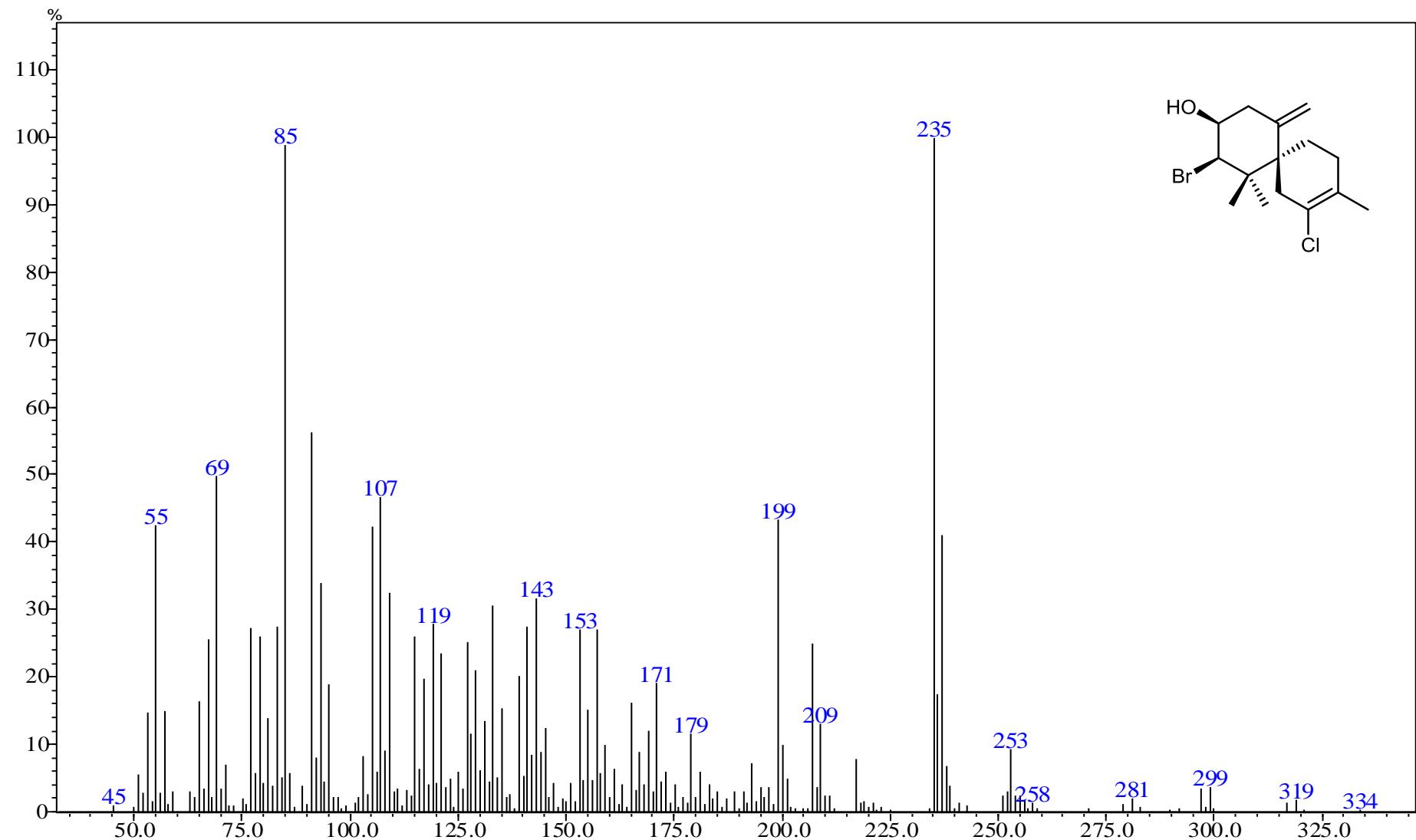
*TESE*

Sinalização química mediando interações ecológicas entre a macroalga vermelha *Laurencia dendroidea* e seu herbívoro associado *Aplysia brasiliiana*

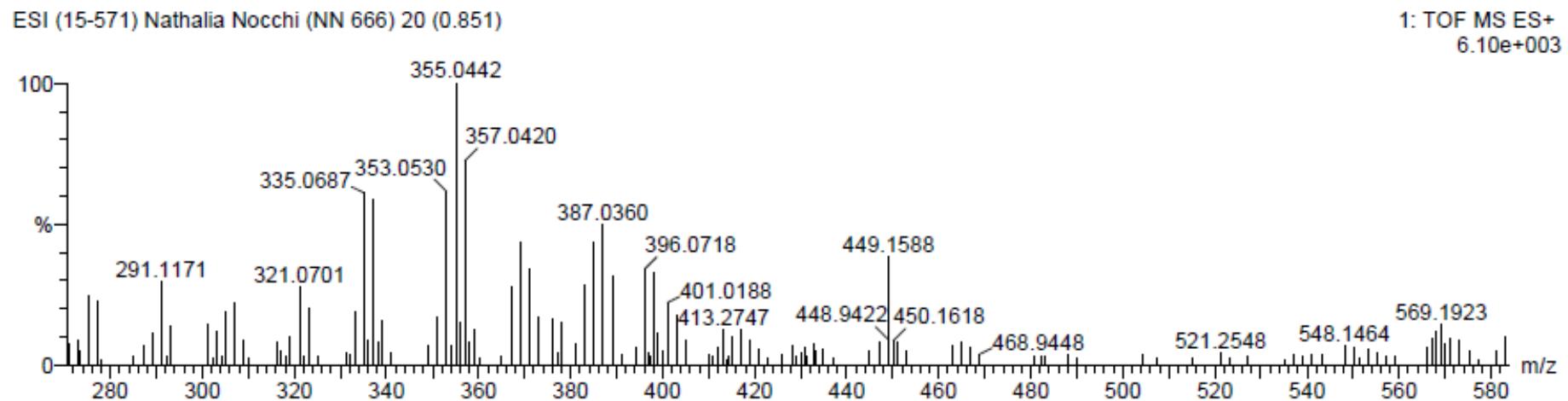
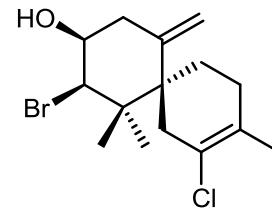
**NATHÁLIA PEIXOTO NOCCHI CARNEIRO**

NITERÓI – RJ

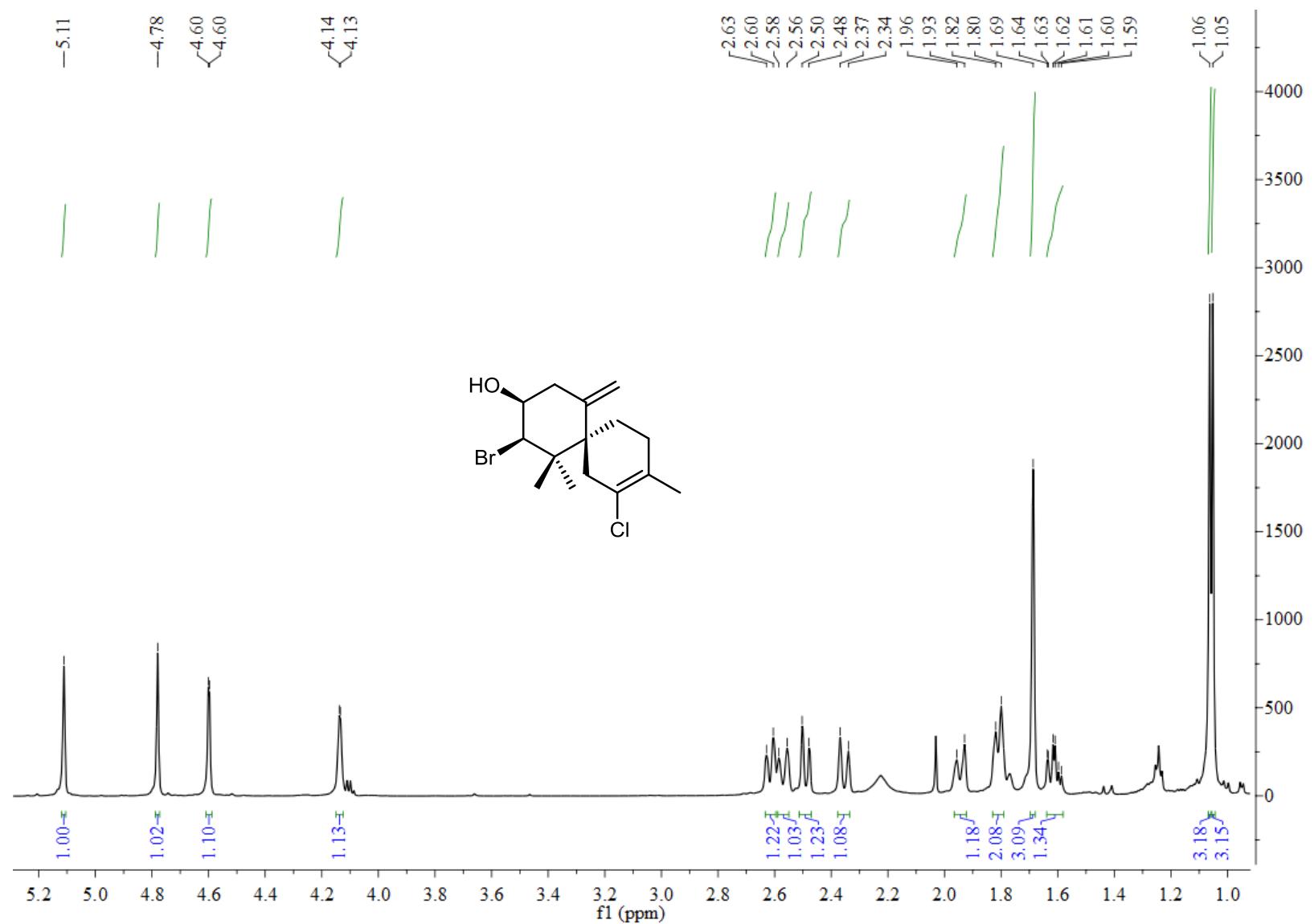
2017



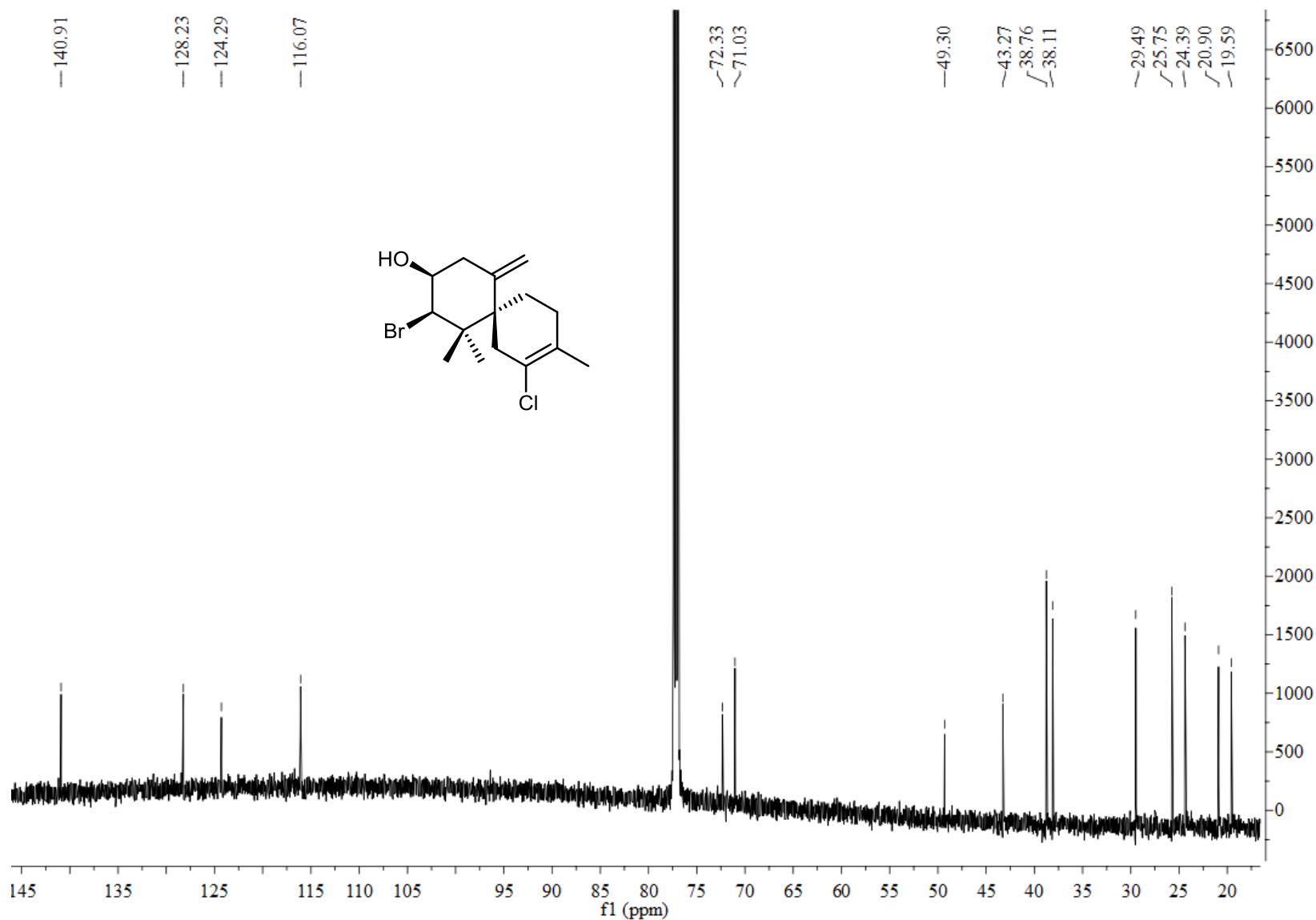
**APÊNDICE 1.** Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70eV) do (+)-elatol



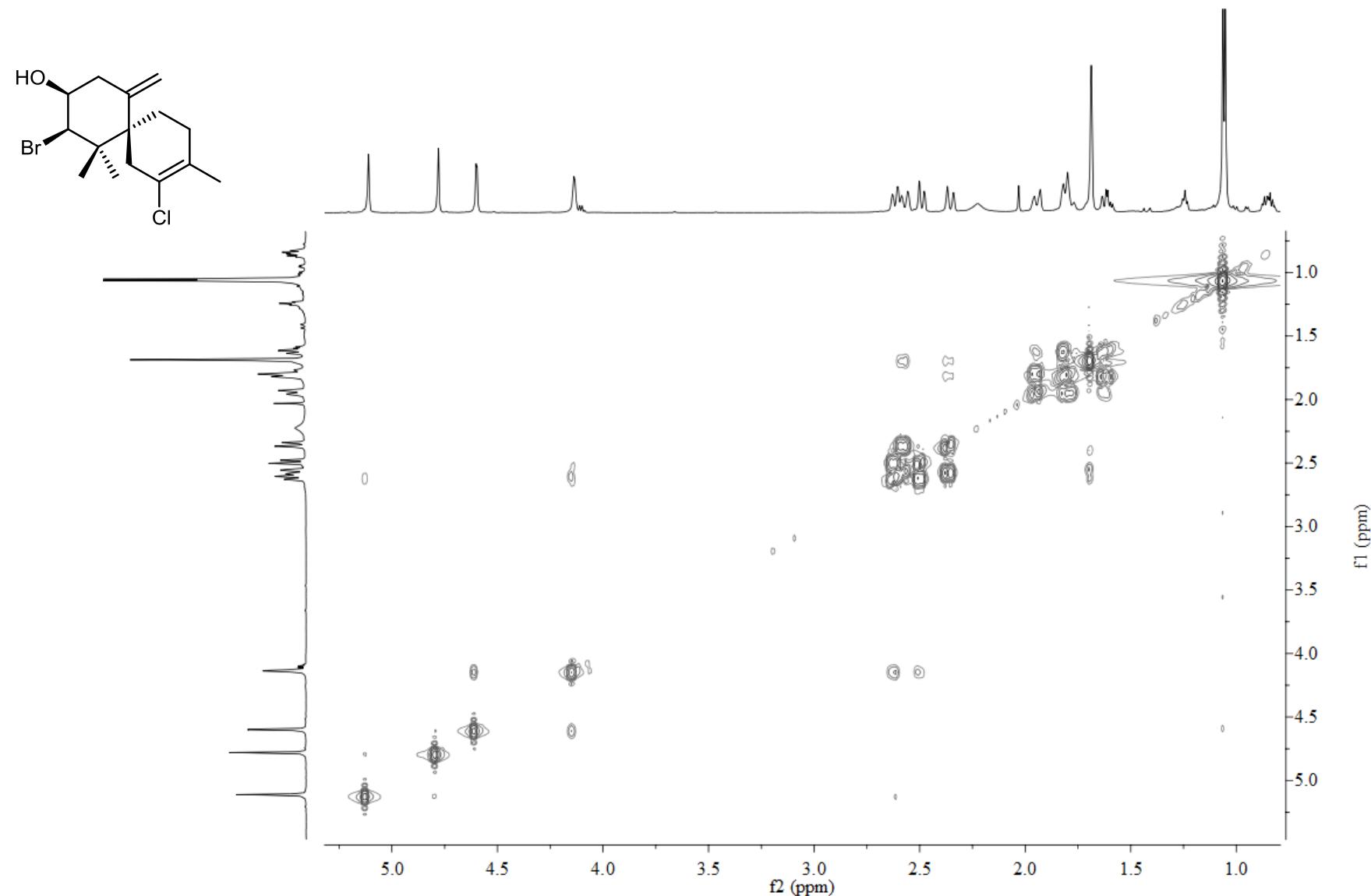
**APÊNDICE 2.** Espectro de massas de alta resolução obtido por electrospray do **(+)-elatol** ( $M+Na$ )



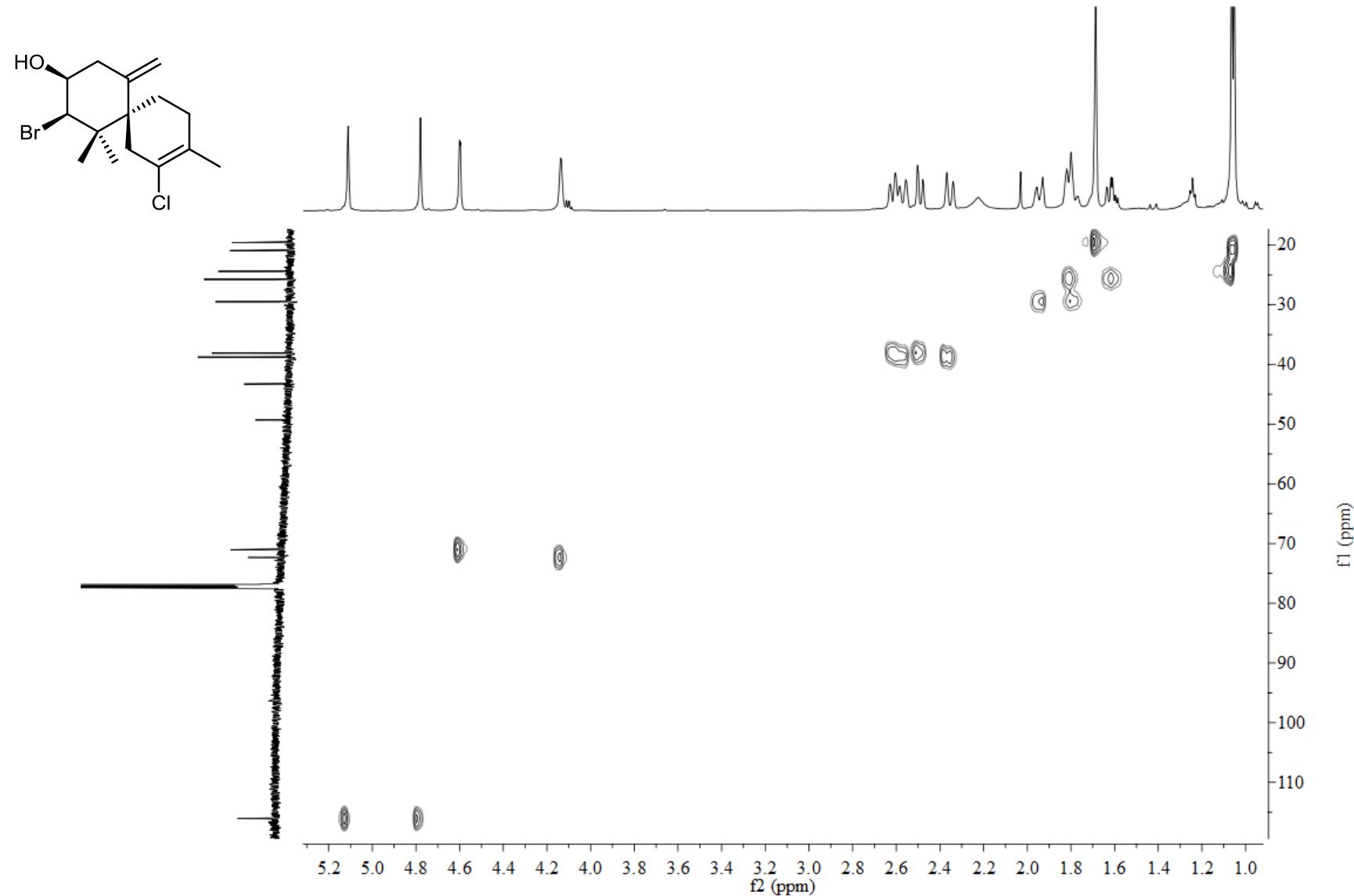
**APÊNDICE 3.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (+)-elatol



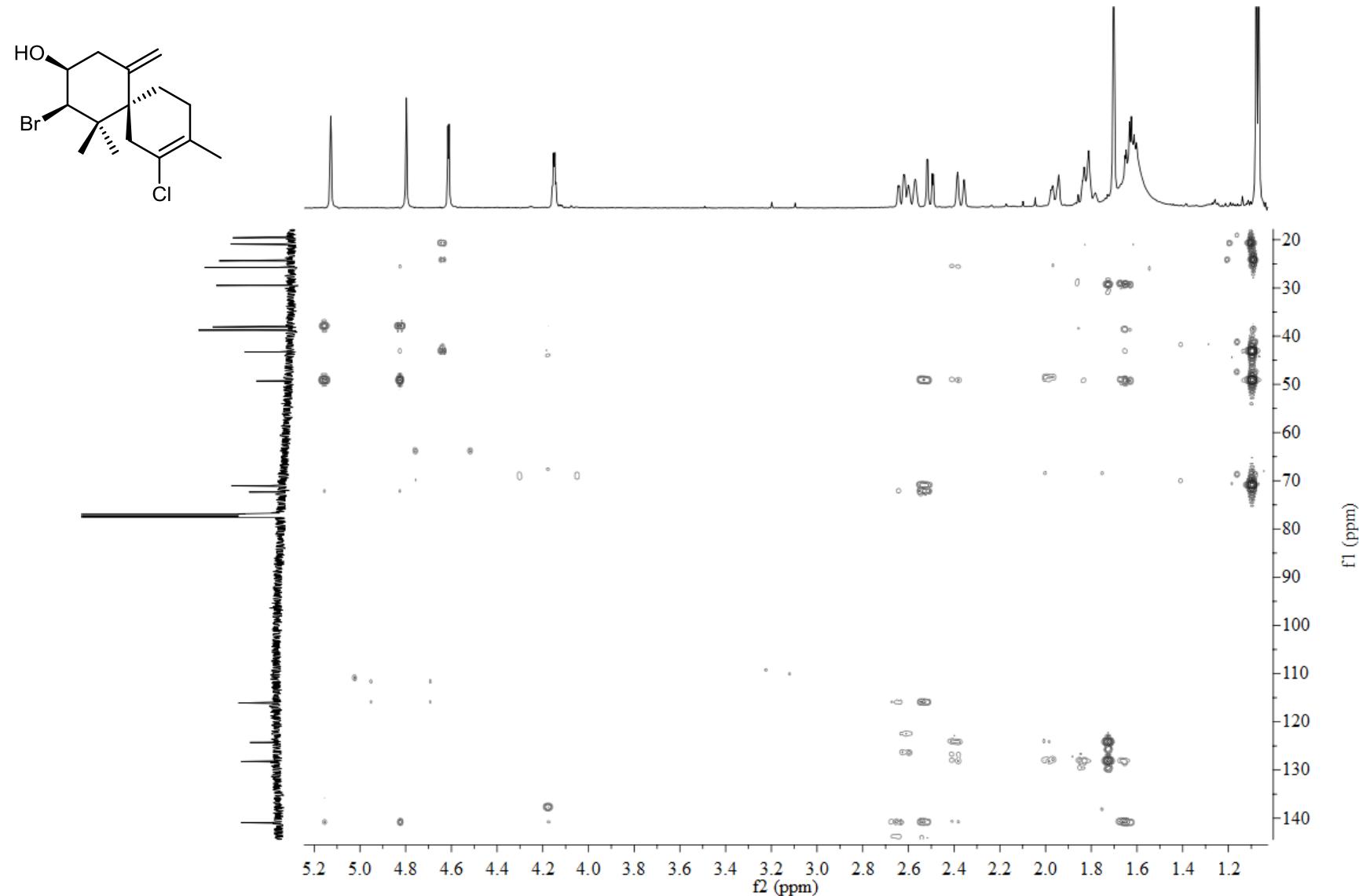
APÊNDICE 4. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (+)-elatol



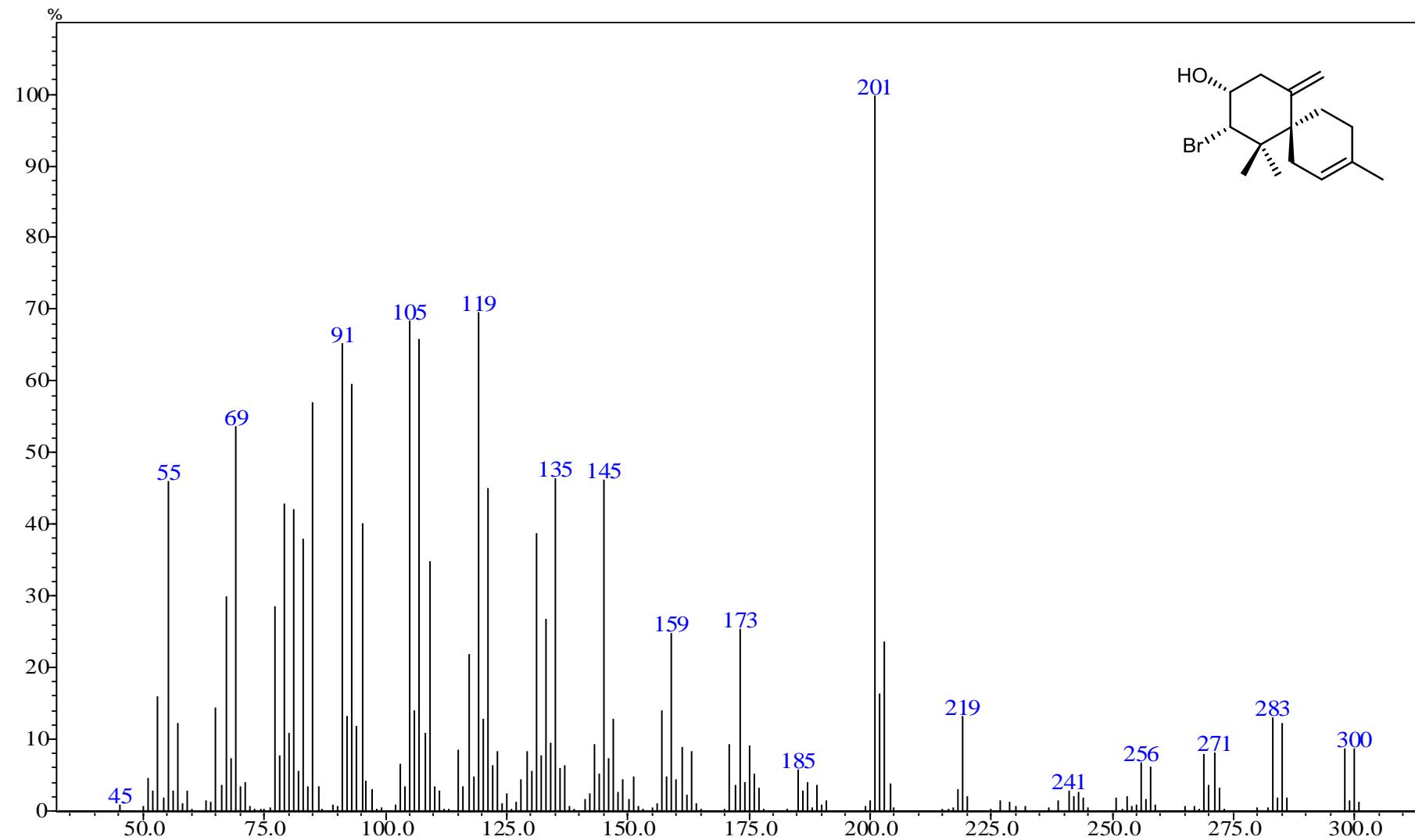
APÊNDICE 5. Espectro de RMN COSY (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (+)-elatol



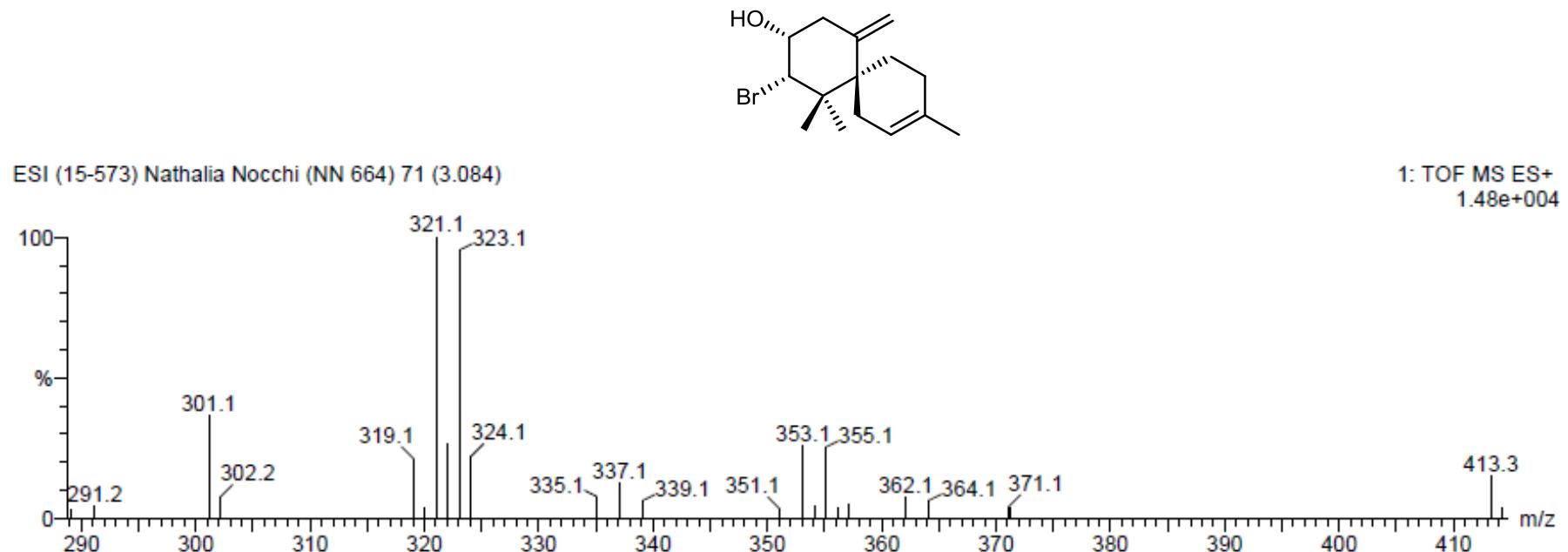
APÊNDICE 6. Espectro de RMN HSQC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do (+)-elatol



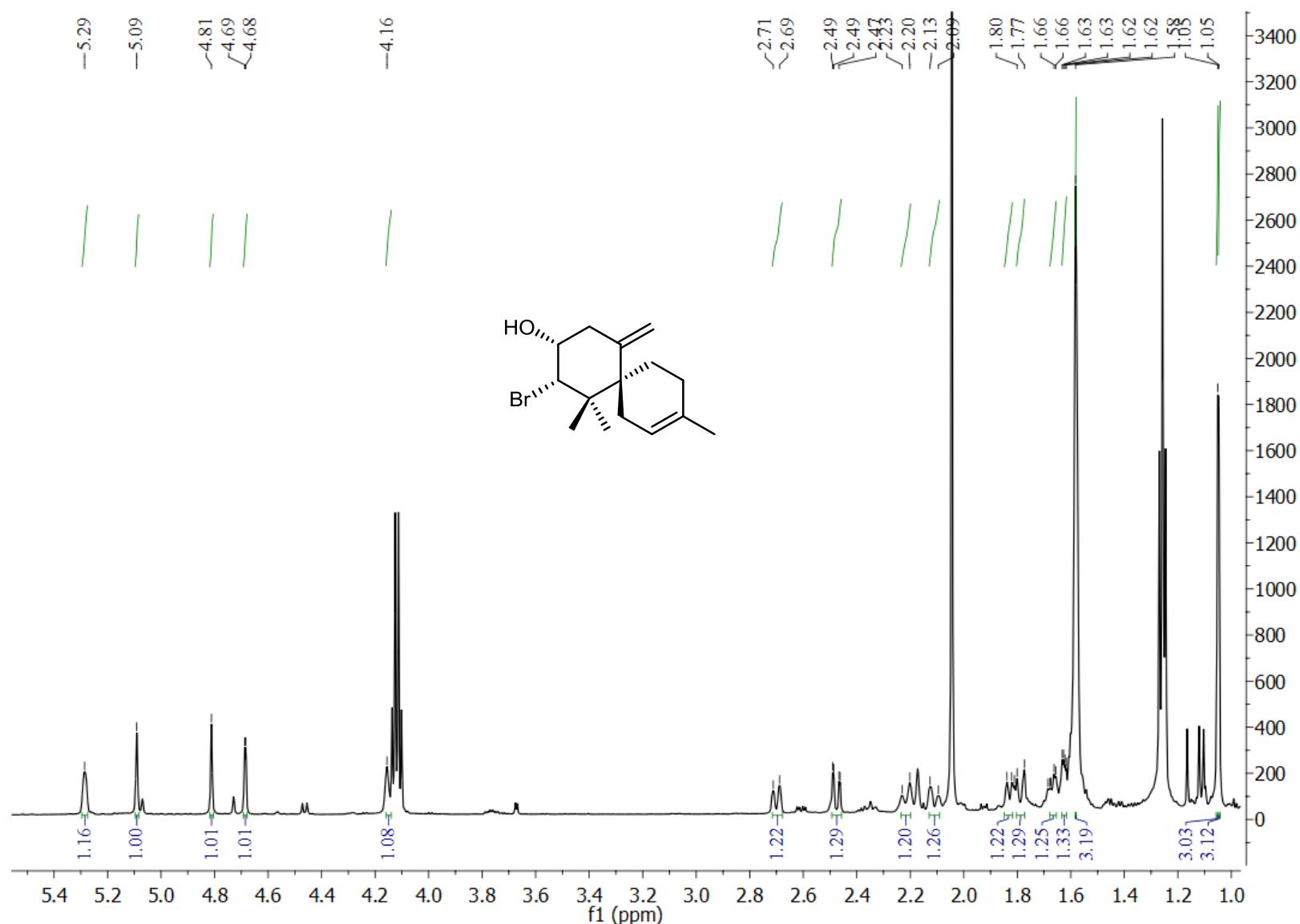
**APÊNDICE 7.** Espectro de RMN HMBC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (+)-elatol



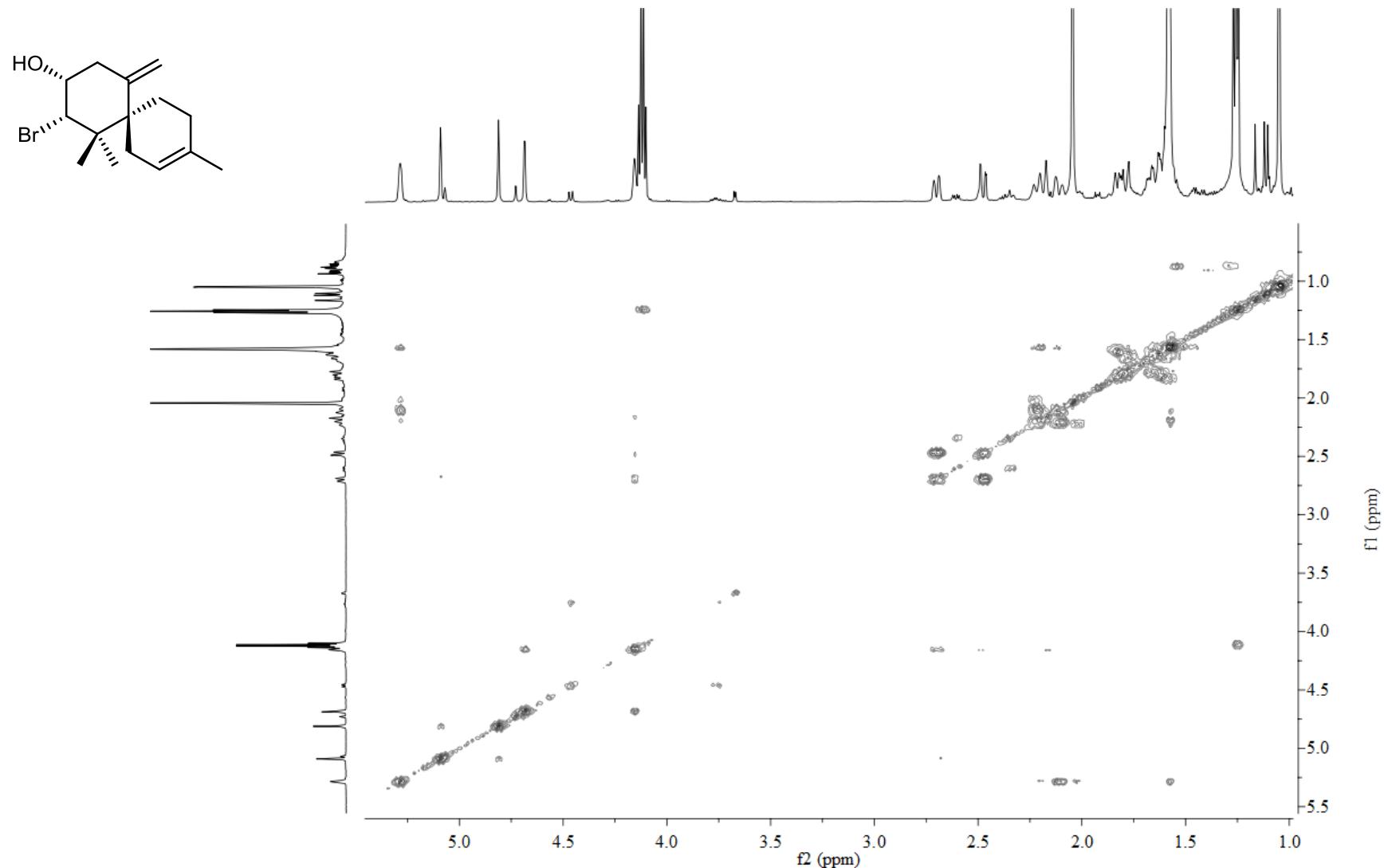
APÊNDICE 8. Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70eV) do **10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno**



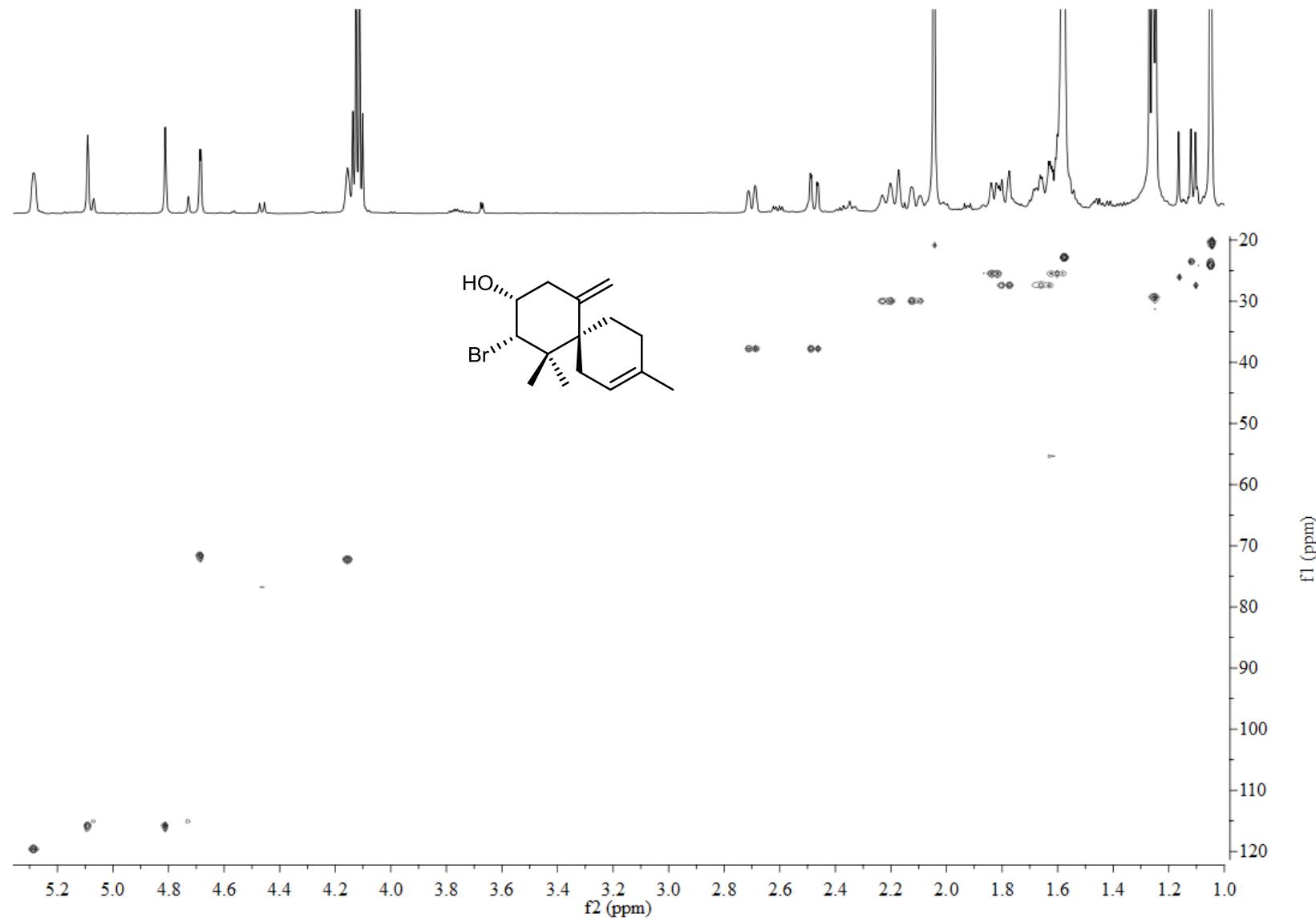
**APÊNDICE 9.** Espectro de massas de alta resolução obtido por electrospray do **10-bromo-9-hidroxy-chamigra-2,7(14)-dieno** ( $M+Na$ )



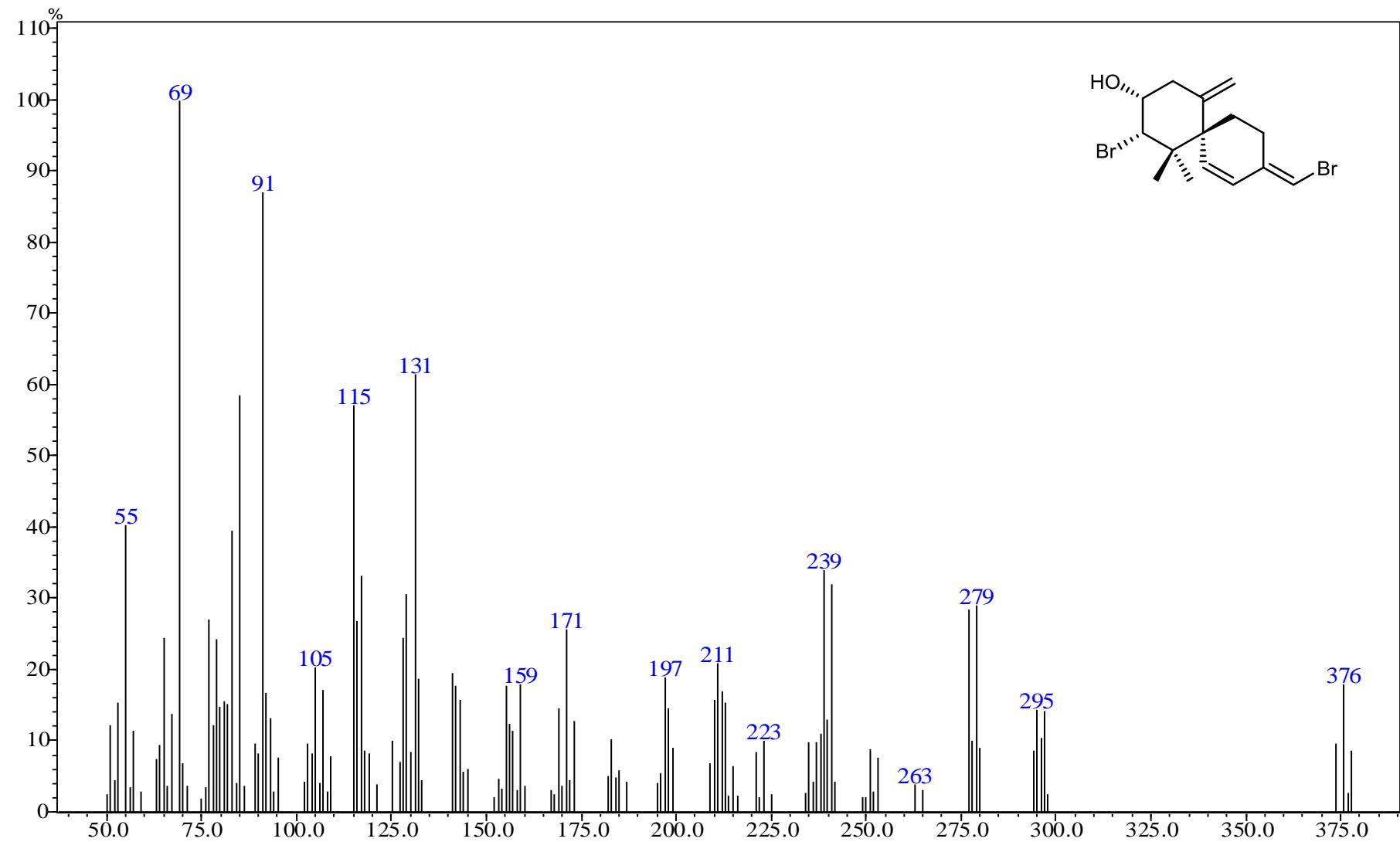
**APÊNDICE 10.** Espectro de RMN hidrogenio (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do **10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno**



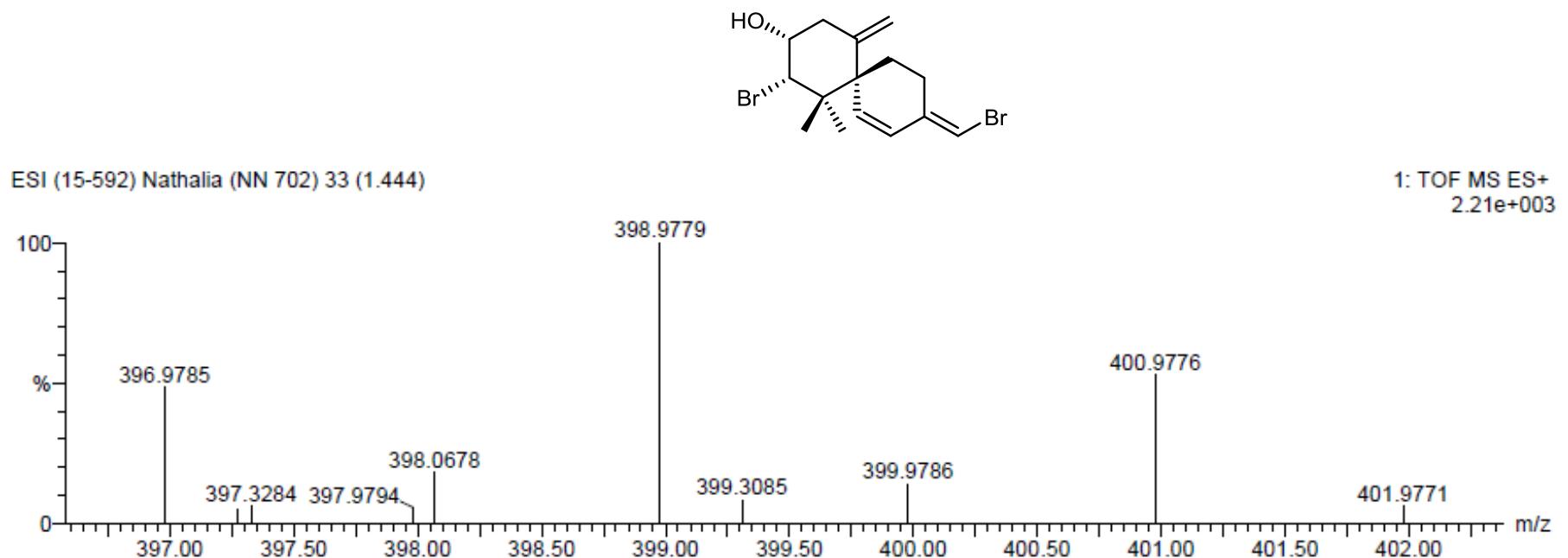
APÊNDICE 11. Espectro de RMN COSY (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do **10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno**



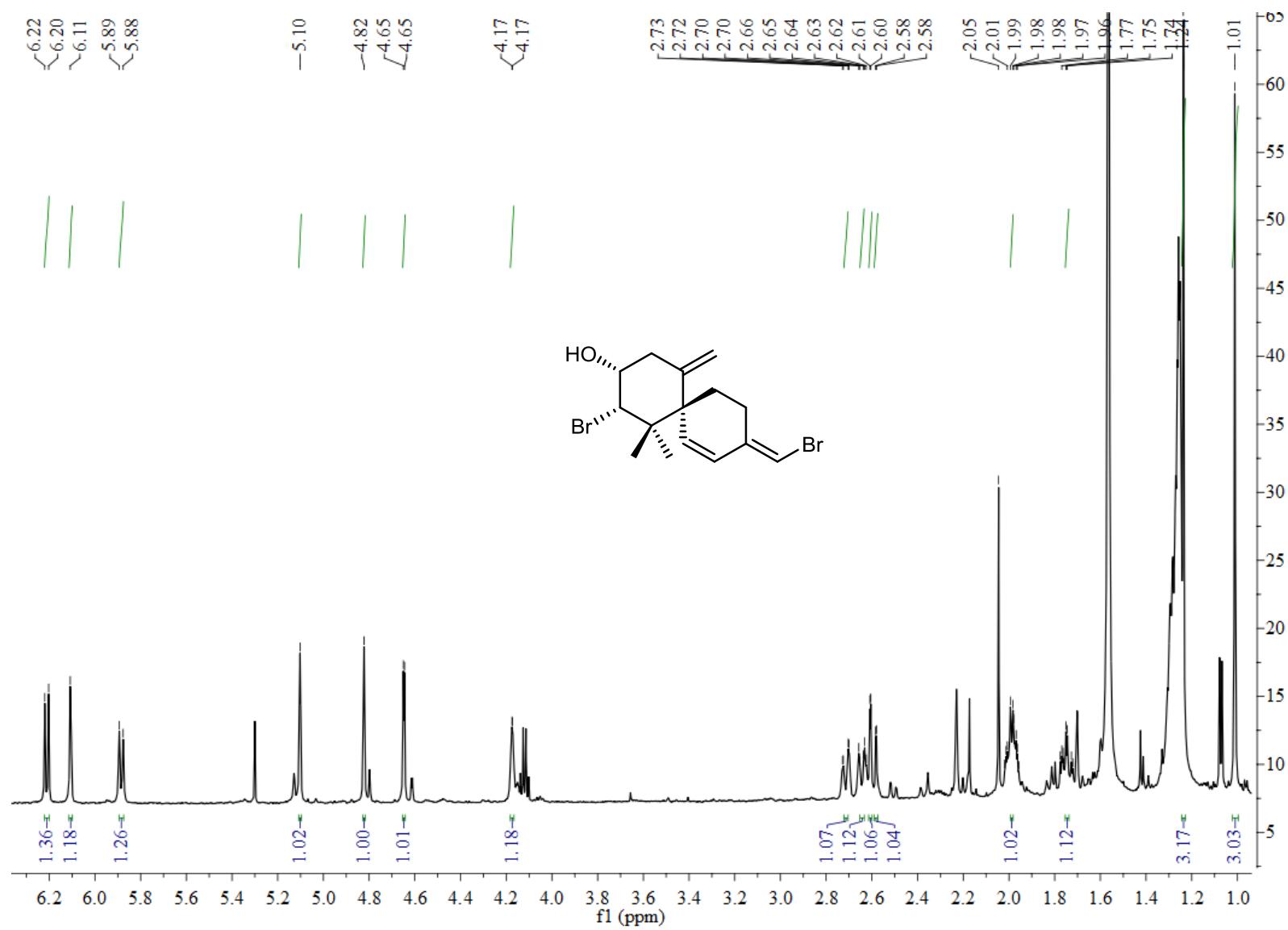
APÊNDICE 12. Espectro de RMN HSQC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do **10-bromo-9-hidroxi-chamigra-2,7(14)-dieno**



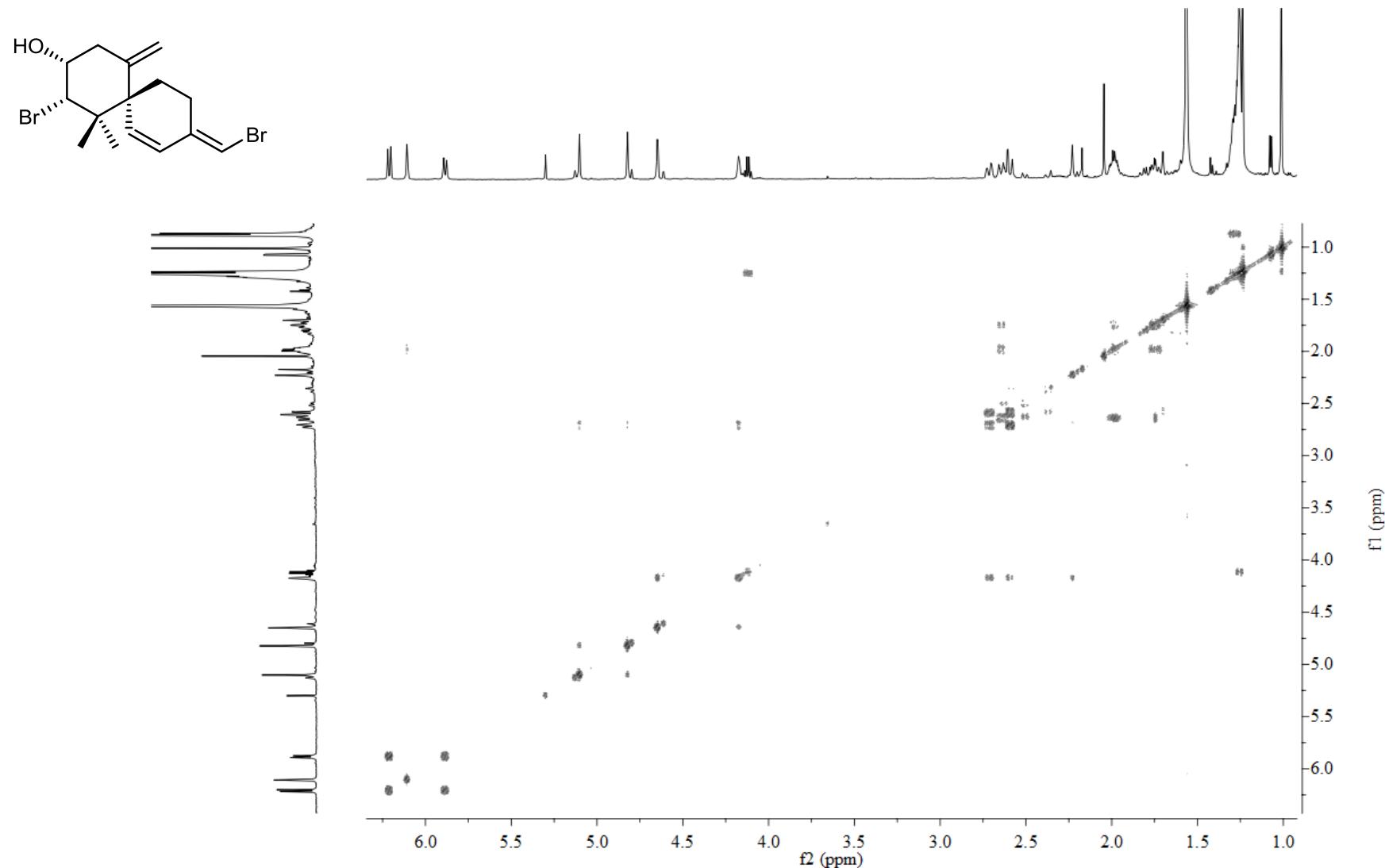
**APÊNDICE 13.** Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70eV) do (Z)-10,15-dibromo-9-hidroxi chamigra-1,3(15),7(14)-triene



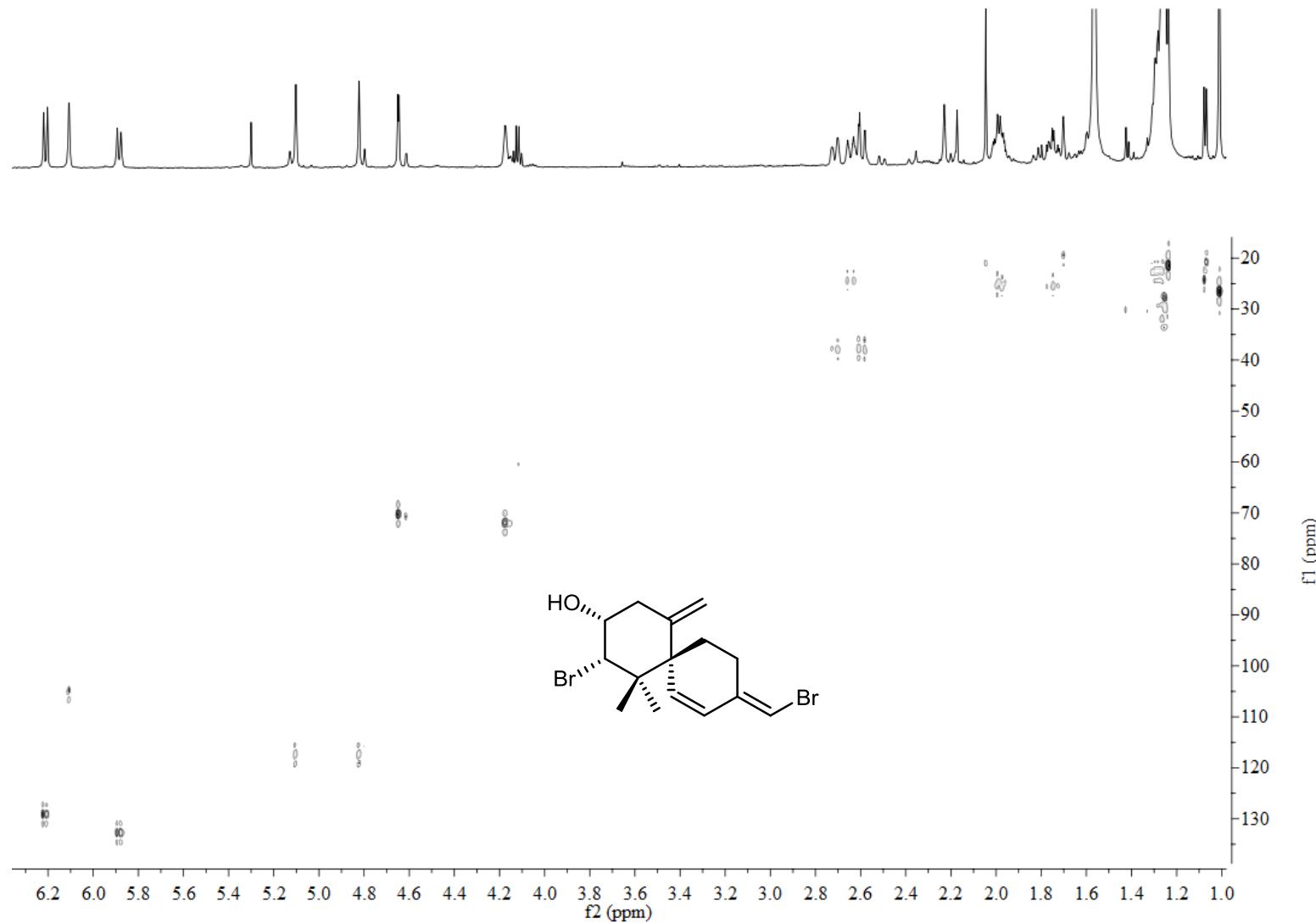
**APÊNDICE 14.** Espectro de massas de alta resolução obtido por electrospray do **(Z)-10,15-dibromo-9-hydroxy chamigra-1,3(15),7(14)-triene dieno (M+Na)**



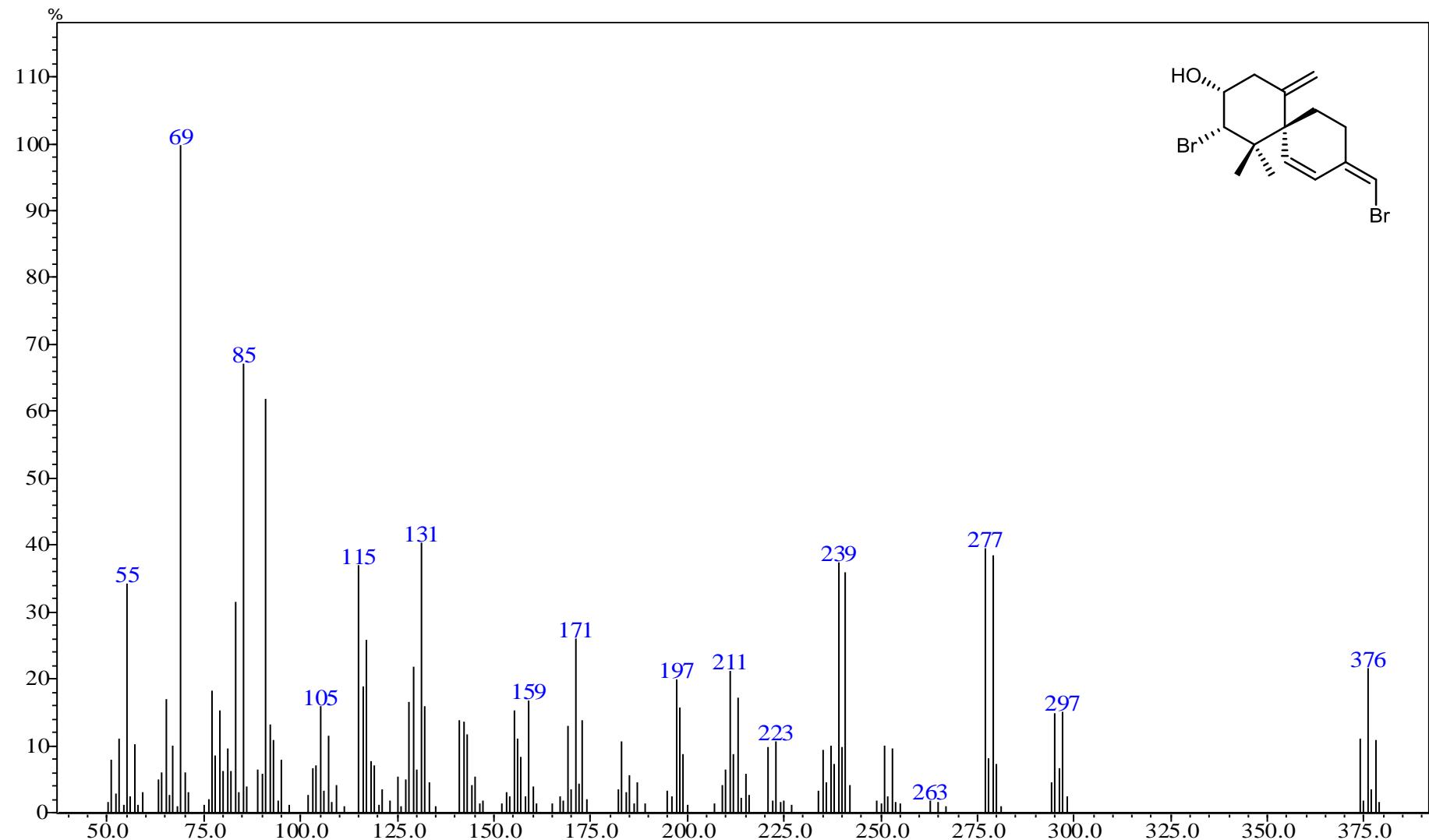
**APÊNDICE 15.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (Z)-10,15-dibromo-9-hidroxila-1,3(15),7(14)-triene



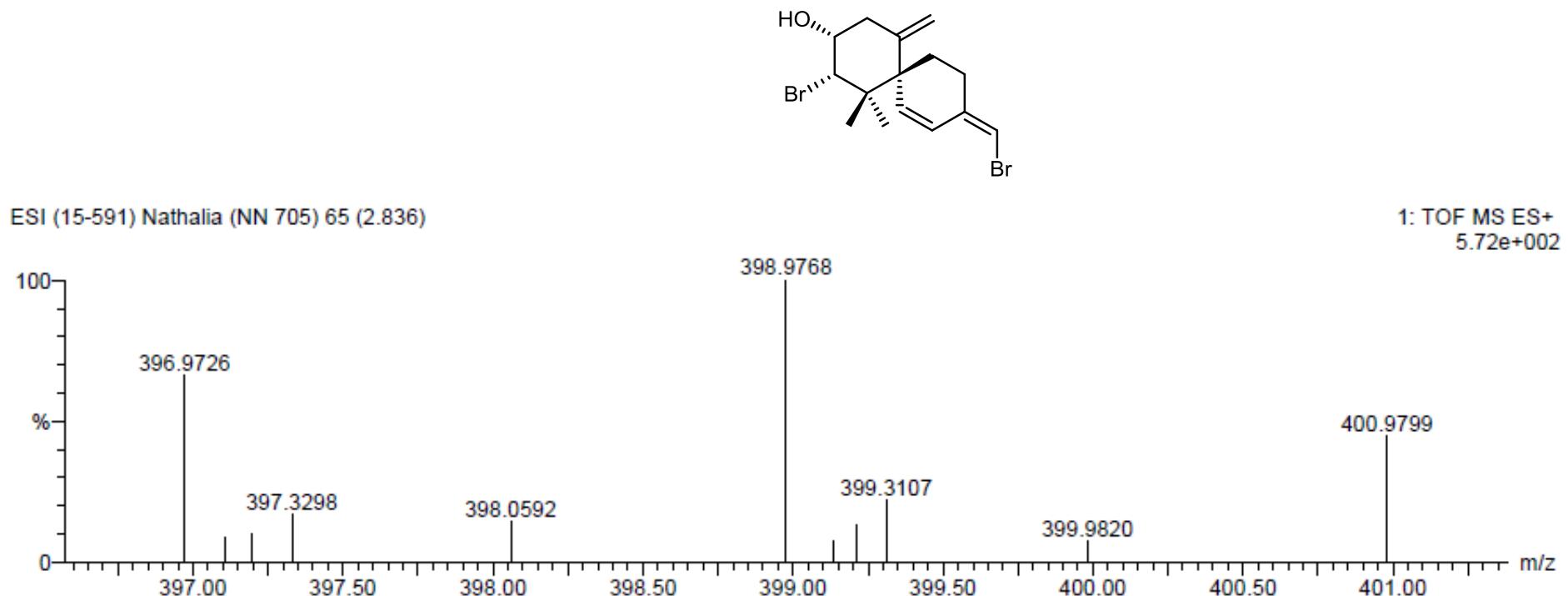
APÊNDICE 16. Espectro de RMN COSY (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (Z)-10,15-dibromo-9-hidroxio chamigra-1,3(15),7(14)-triene



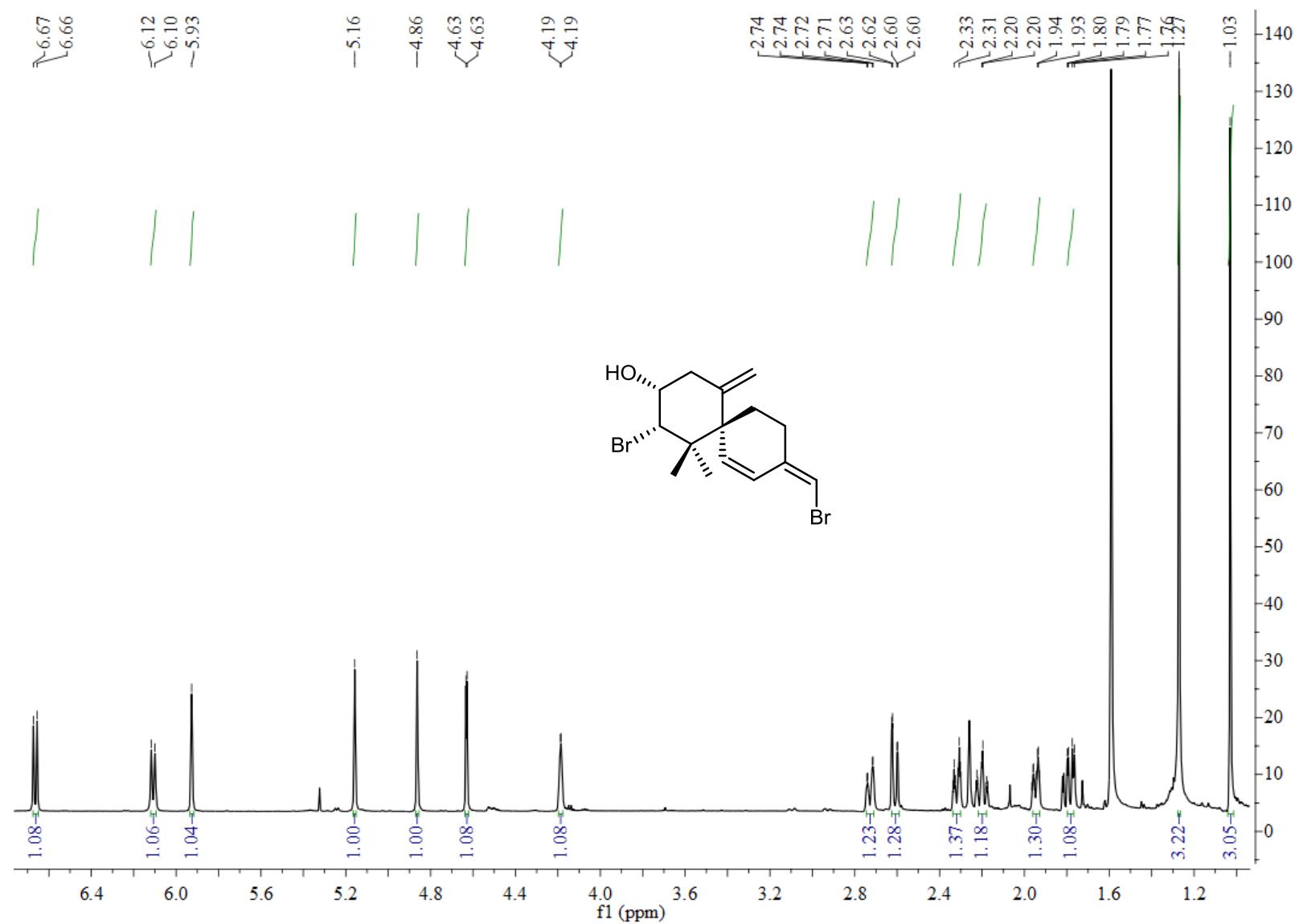
APÊNDICE 17. Espectro de RMN HQSC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do (Z)-10,15-dibromo-9-hidroxio chamigra-1,3(15),7(14)-triene



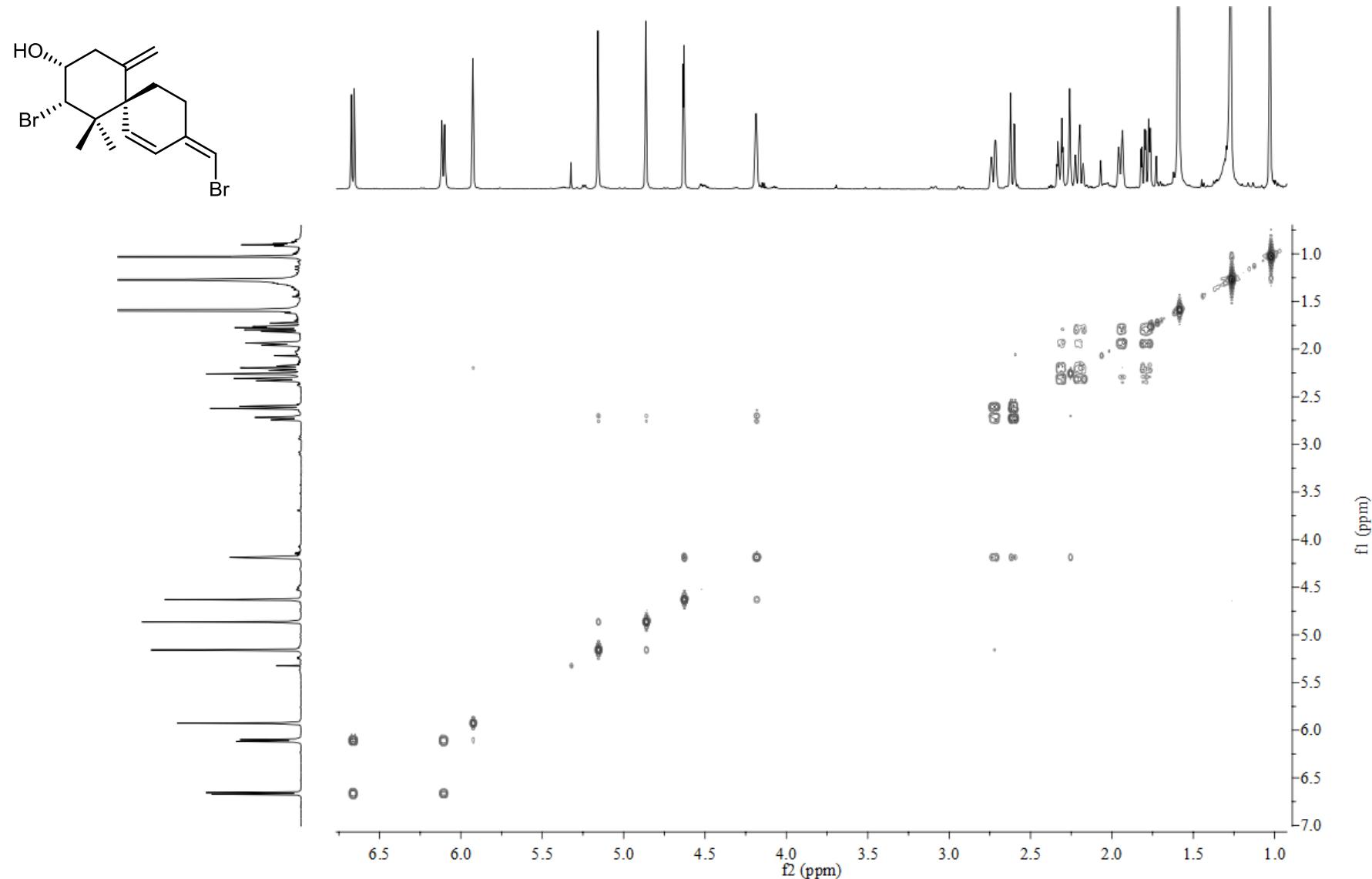
**APÊNDICE 18.** Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70eV) do **(E)-10,15-dibromo-9-hydroxy chamigra-1,3(15),7(14)-triene**



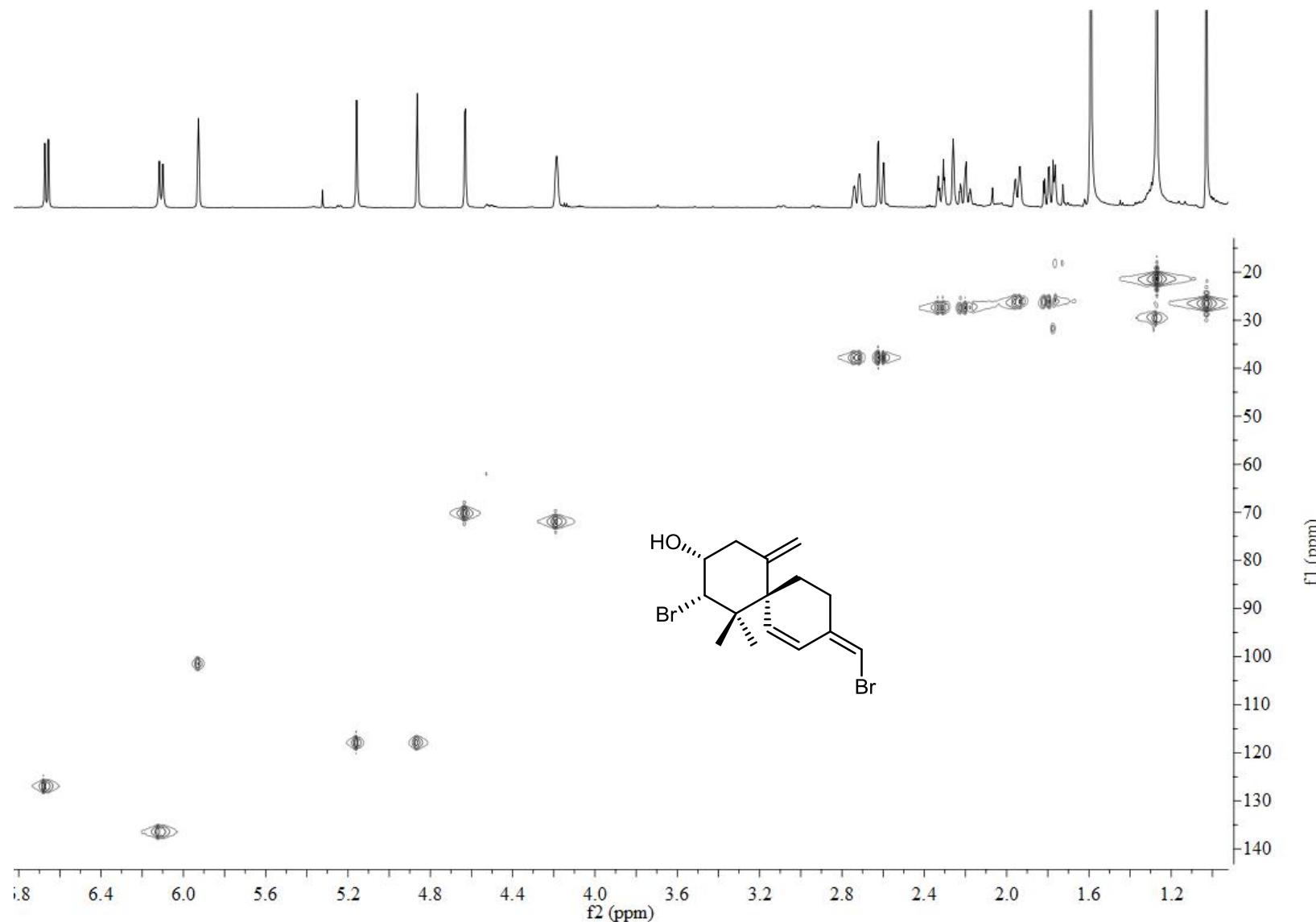
**APÊNDICE 19.** Espectro de massas de alta resolução obtido por electrospray do **(E)-10,15-dibromo-9-hydroxy chamigra-1,3(15),7(14)-triene dieno (M+Na)**



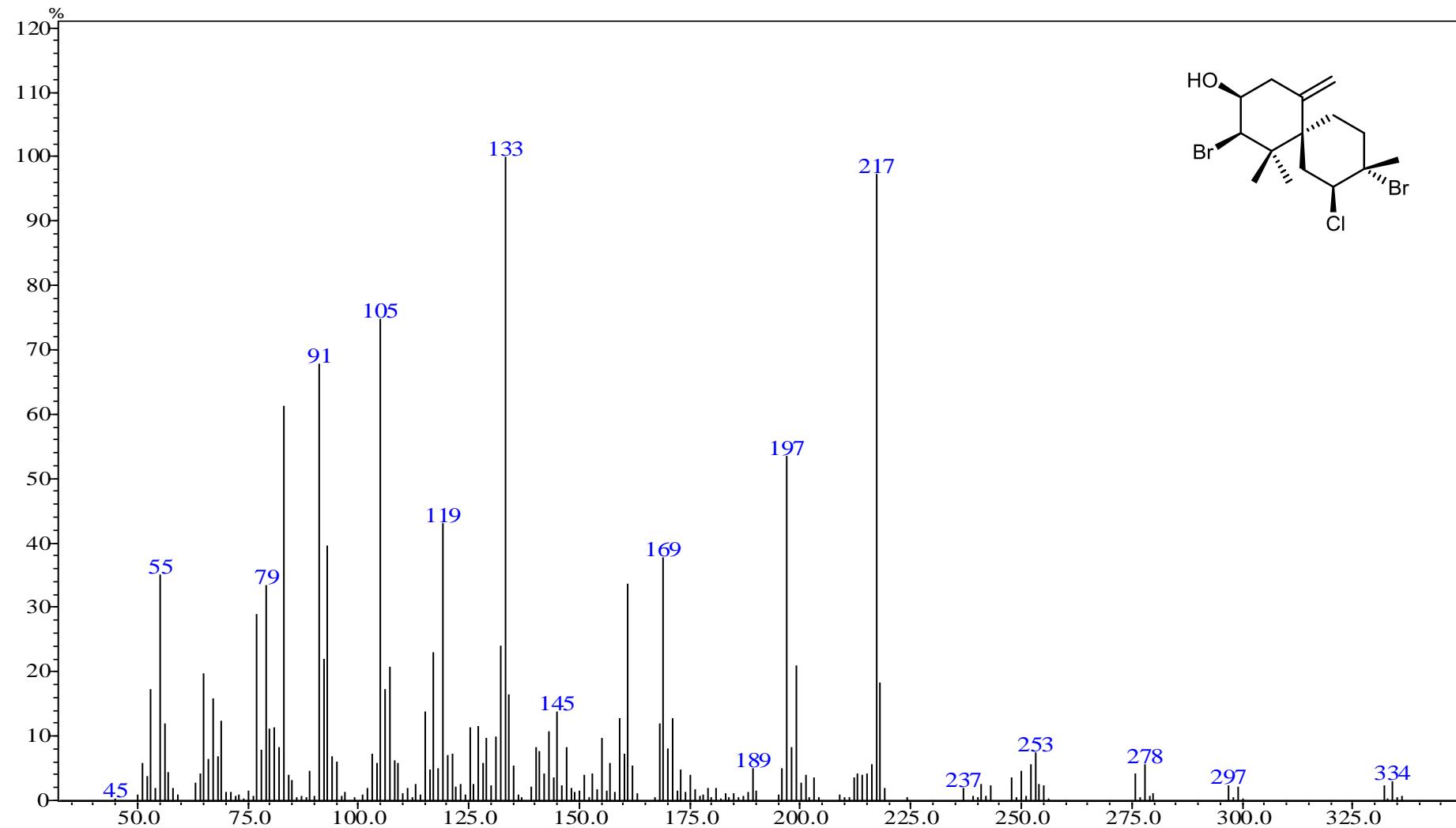
**APÊNDICE 20.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (E)-10,15-dibromo-9-hidroxio chamigra-1,3(15),7(14)-triene



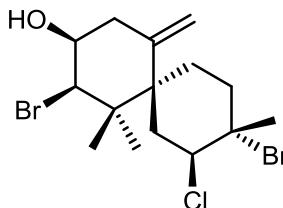
**ANEXO 21.** Espectro de RMN COSY (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do  $(E)$ -10,15-dibromo-9-hidroxio chamigra-1,3(15),7(14)-triene



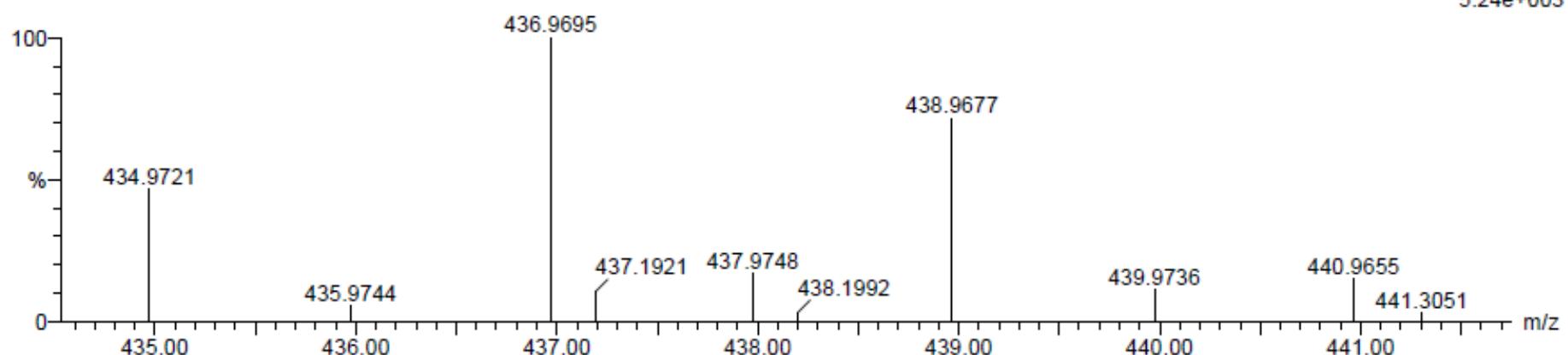
**APÊNDICE 22.** Espectro de RMN HSQC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do (*E*)-10,15-dibromo-9-hidroxio chamigra-1,3(15),7(14)-triene



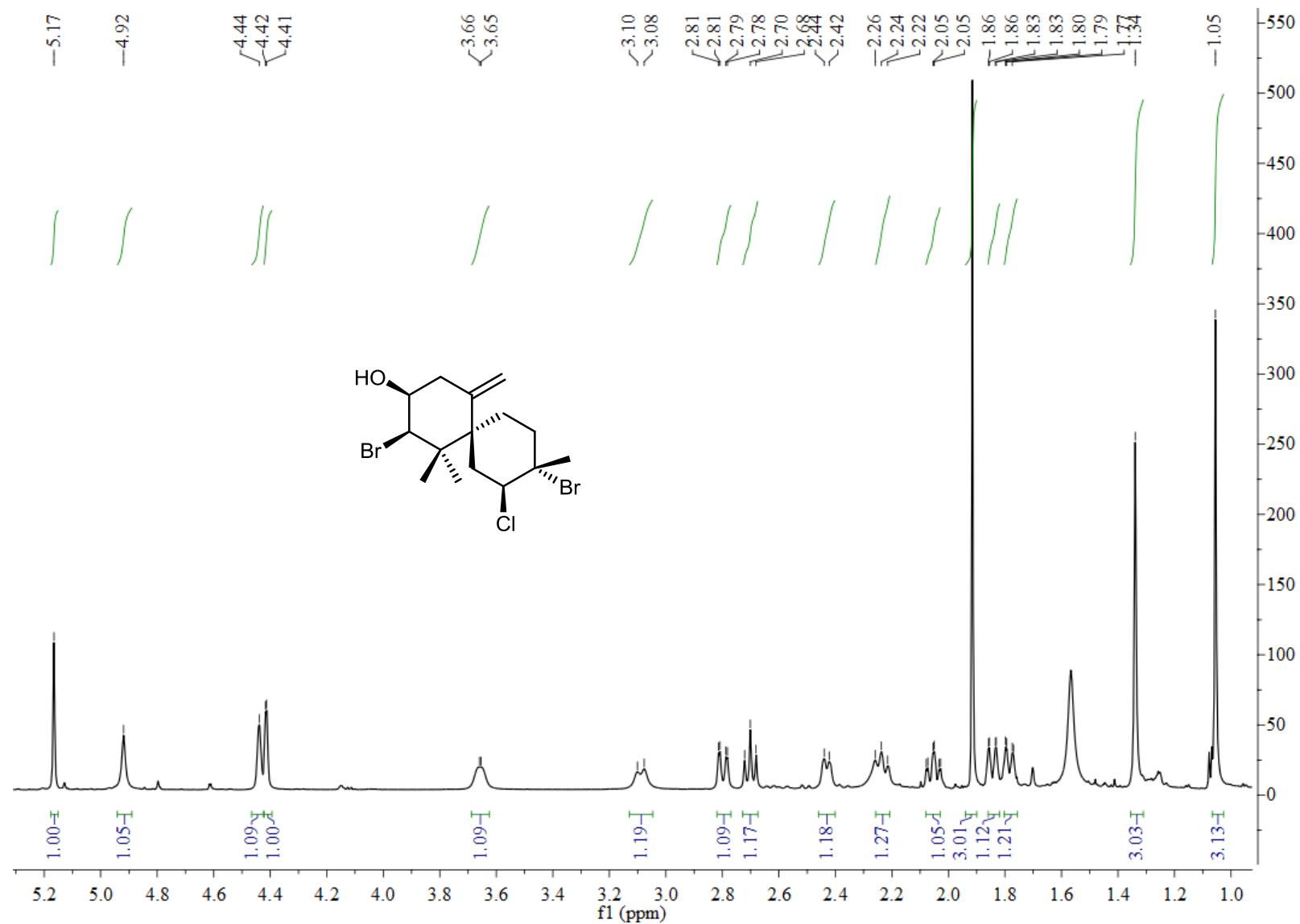
**ANEXO 23.** Espectro de massas obtido por impacto de elétrons (70eV) do **isoobtusol**



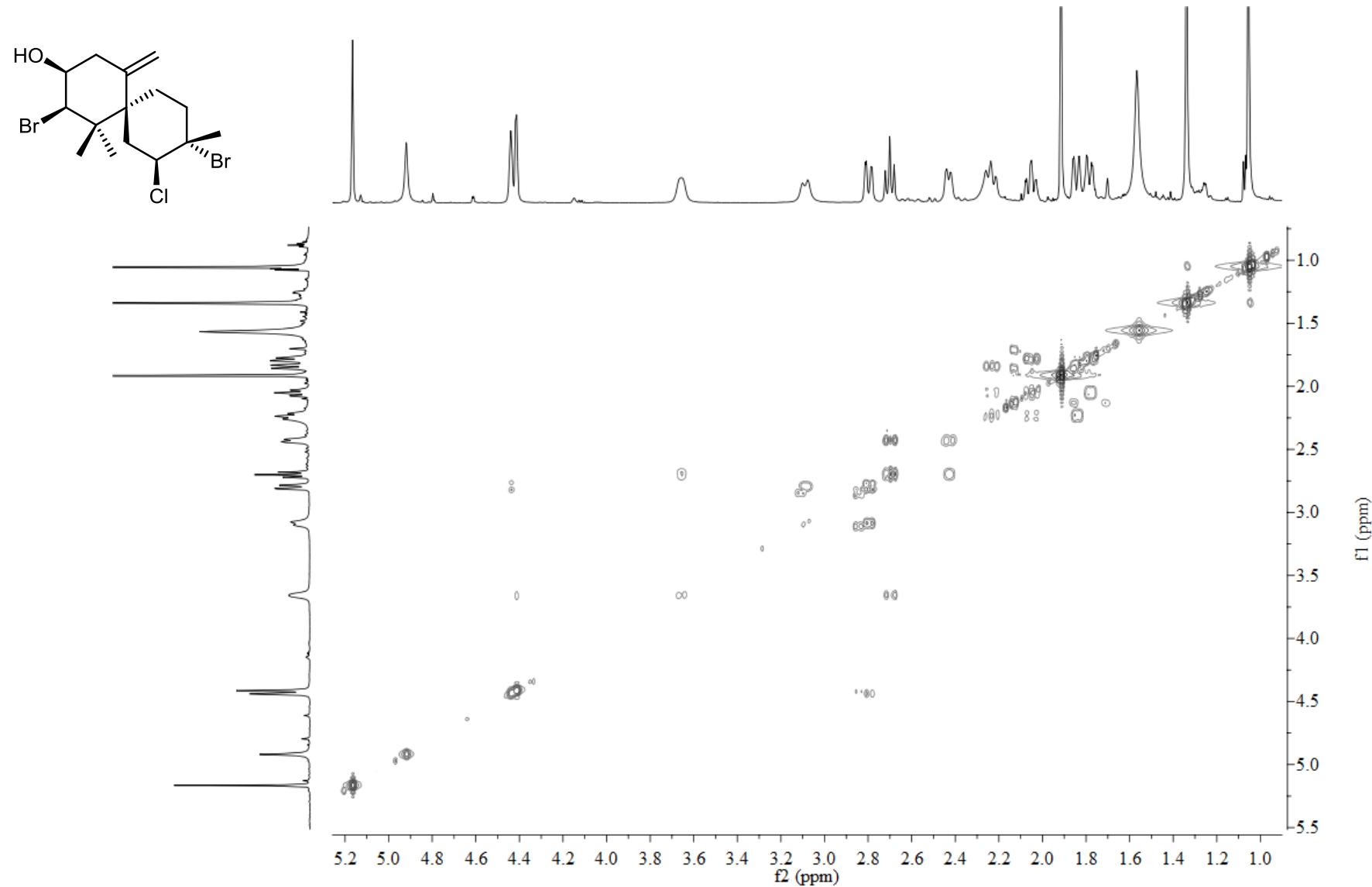
ESI (15-572) Nathalia Nocchi (NN 722) 74 (3.221)

1: TOF MS ES+  
5.24e+003

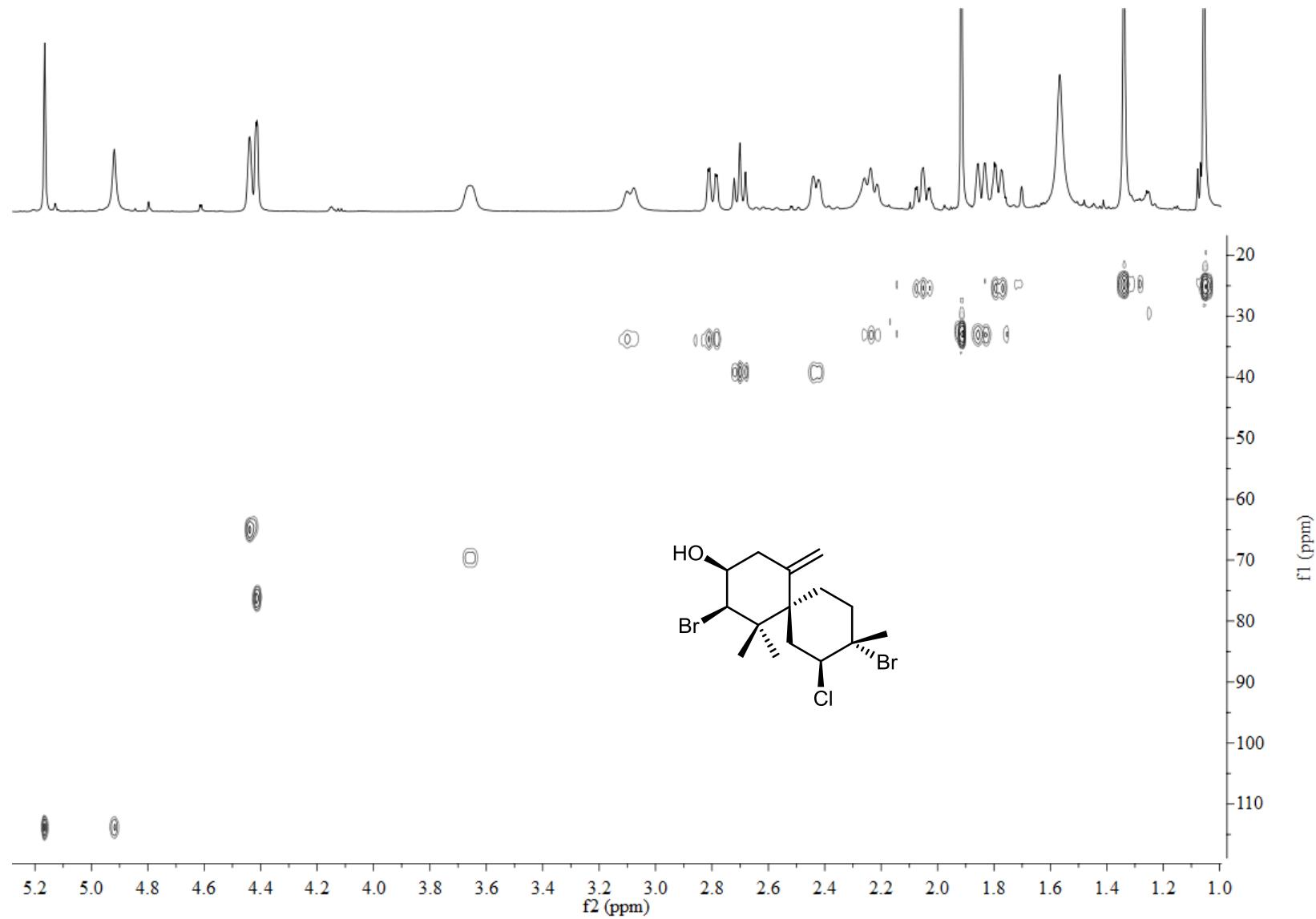
**APÊNDICE 24.** Espectro de massas de alta resolução obtido por electrospray do **isobtusol** ( $M+Na$ )



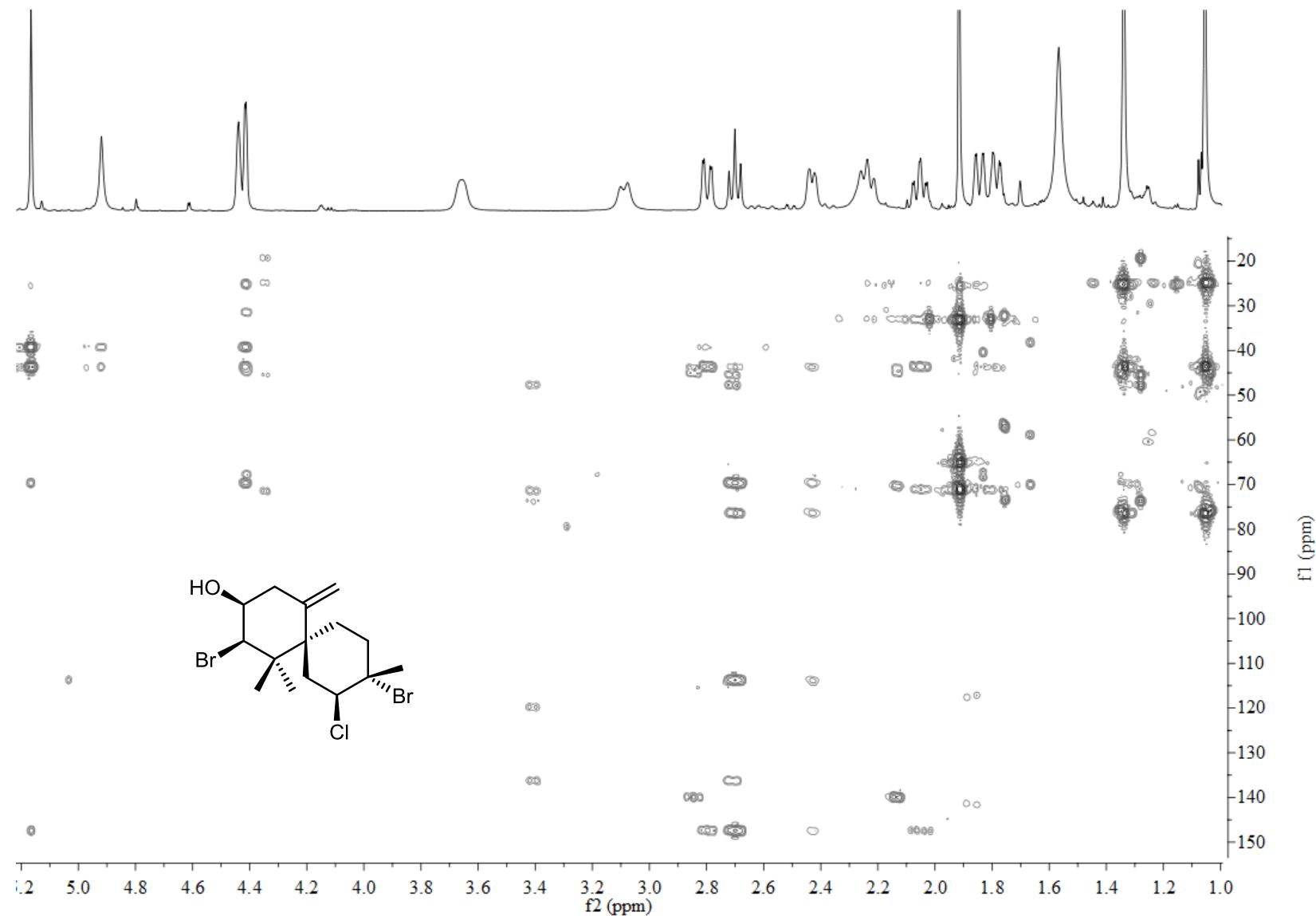
**APÊNDICE 25.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do **isobtusol**



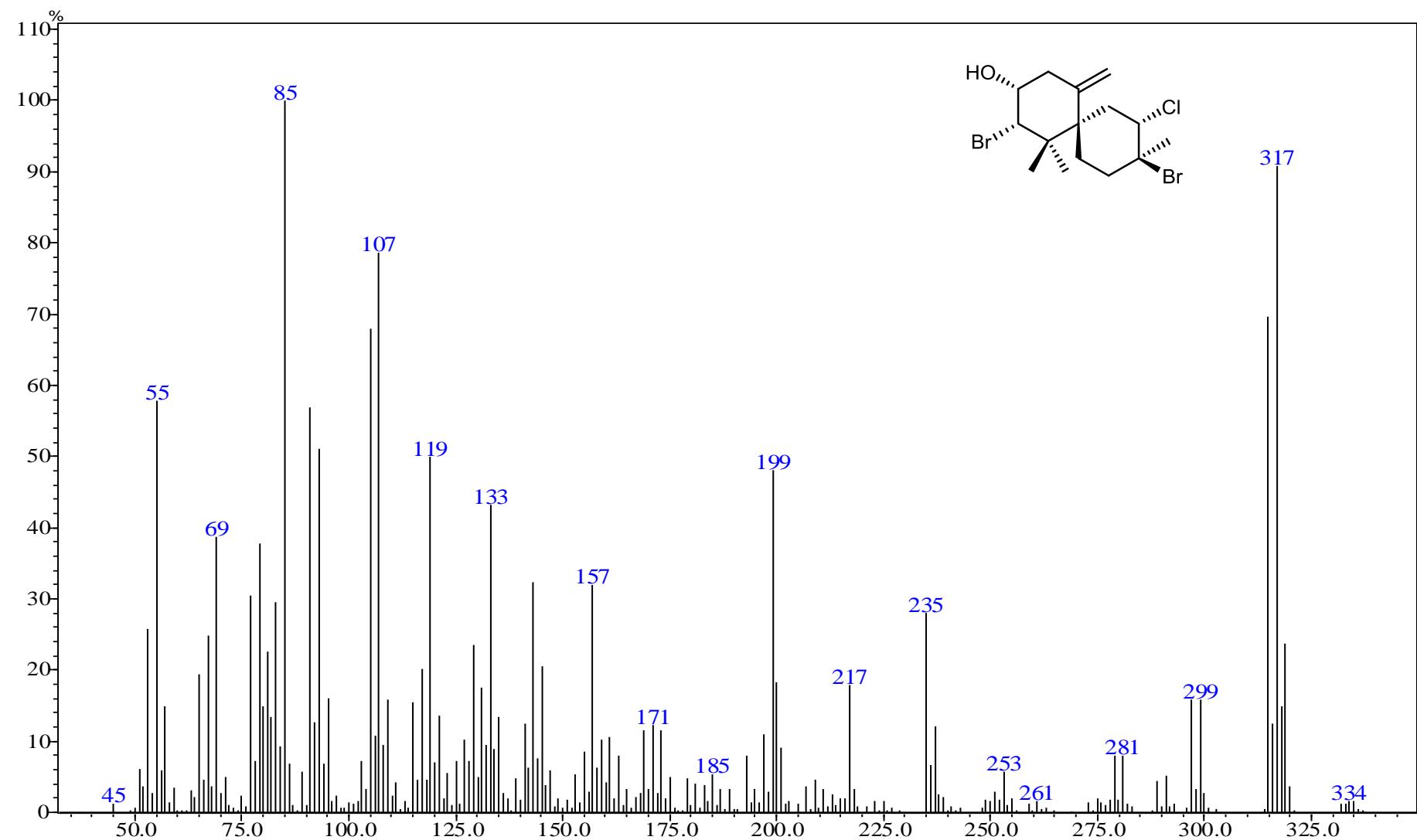
APÊNDICE 26. Espectro de RMN COSY (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do **isobtusol**



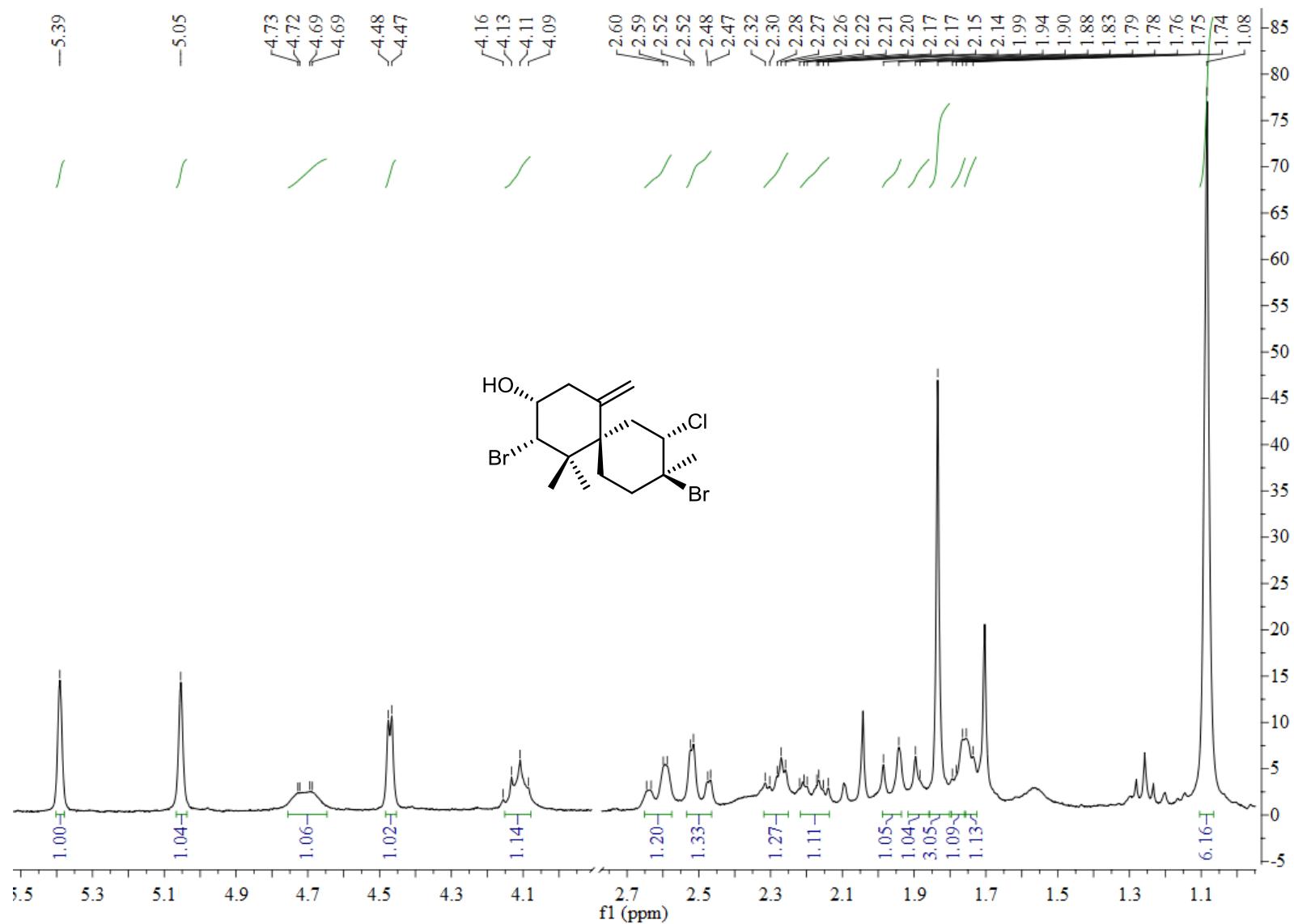
APÊNDICE 27. Espectro de RMN HSQC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do **isobtusol**



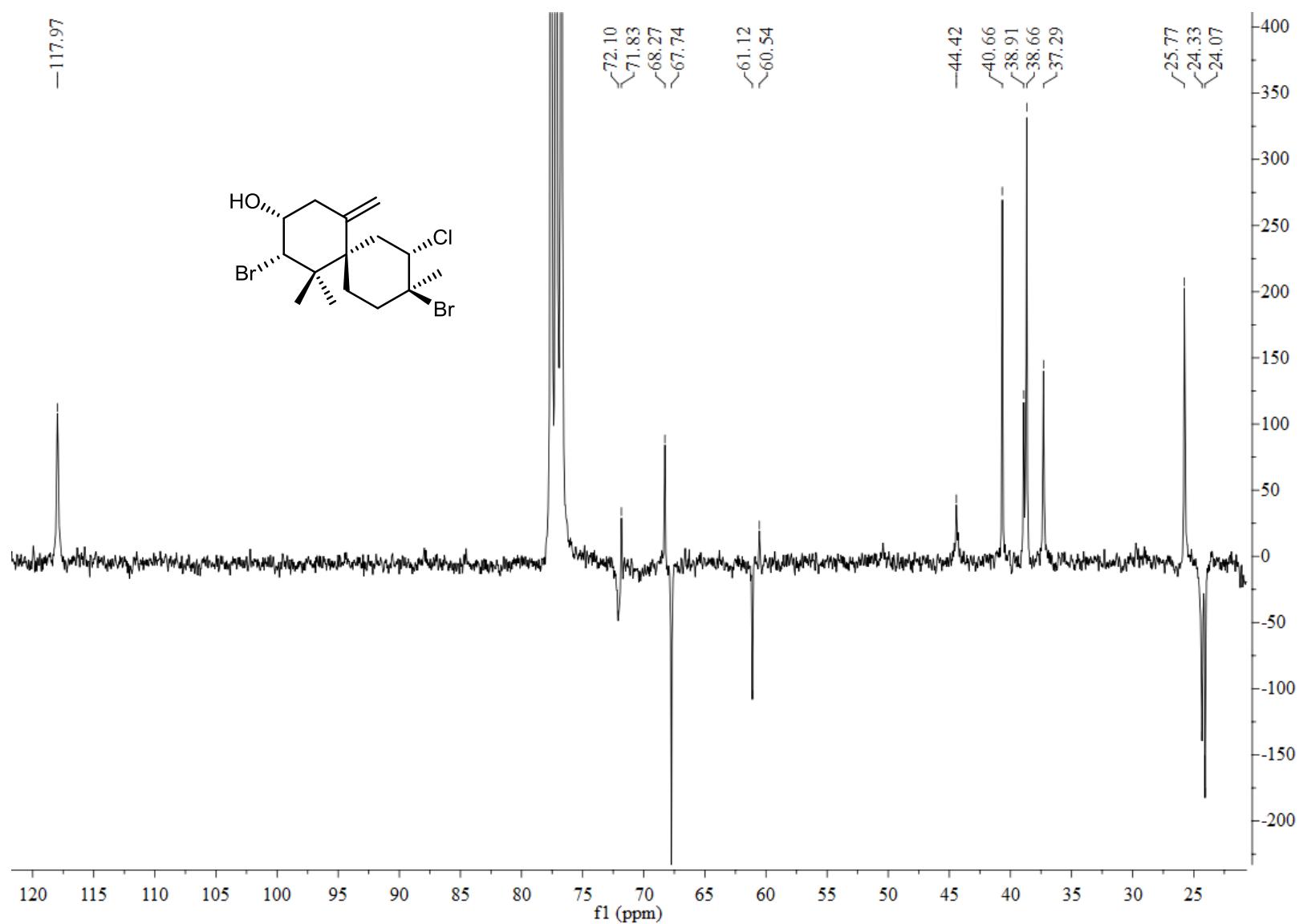
**APÊNDICE 28.** Espectro de RMN HMBC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do **isobtusol**



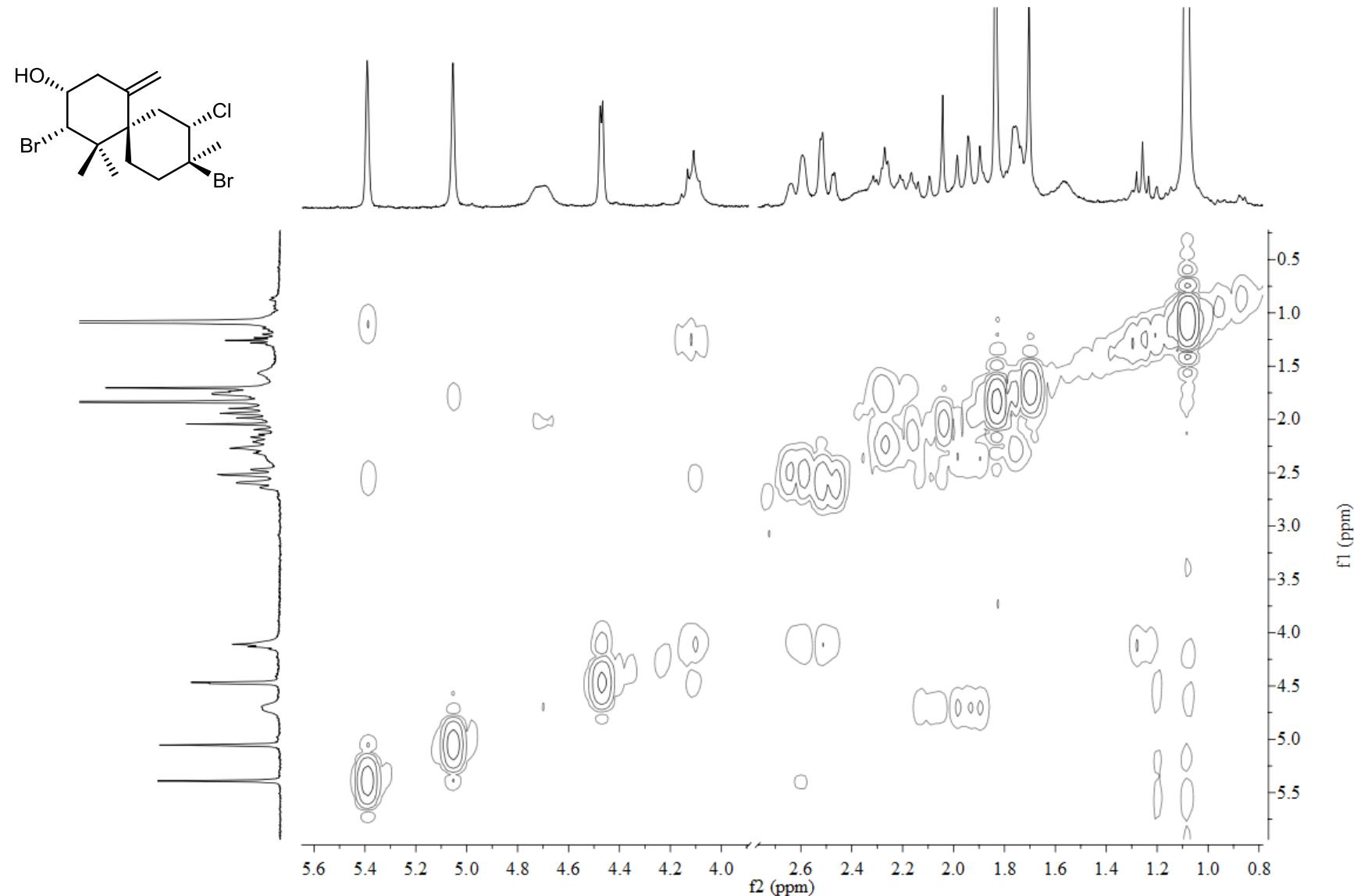
APÊNDICE 29. Espectro de massas por impacto de elétrons (70eV) do **obtusol**



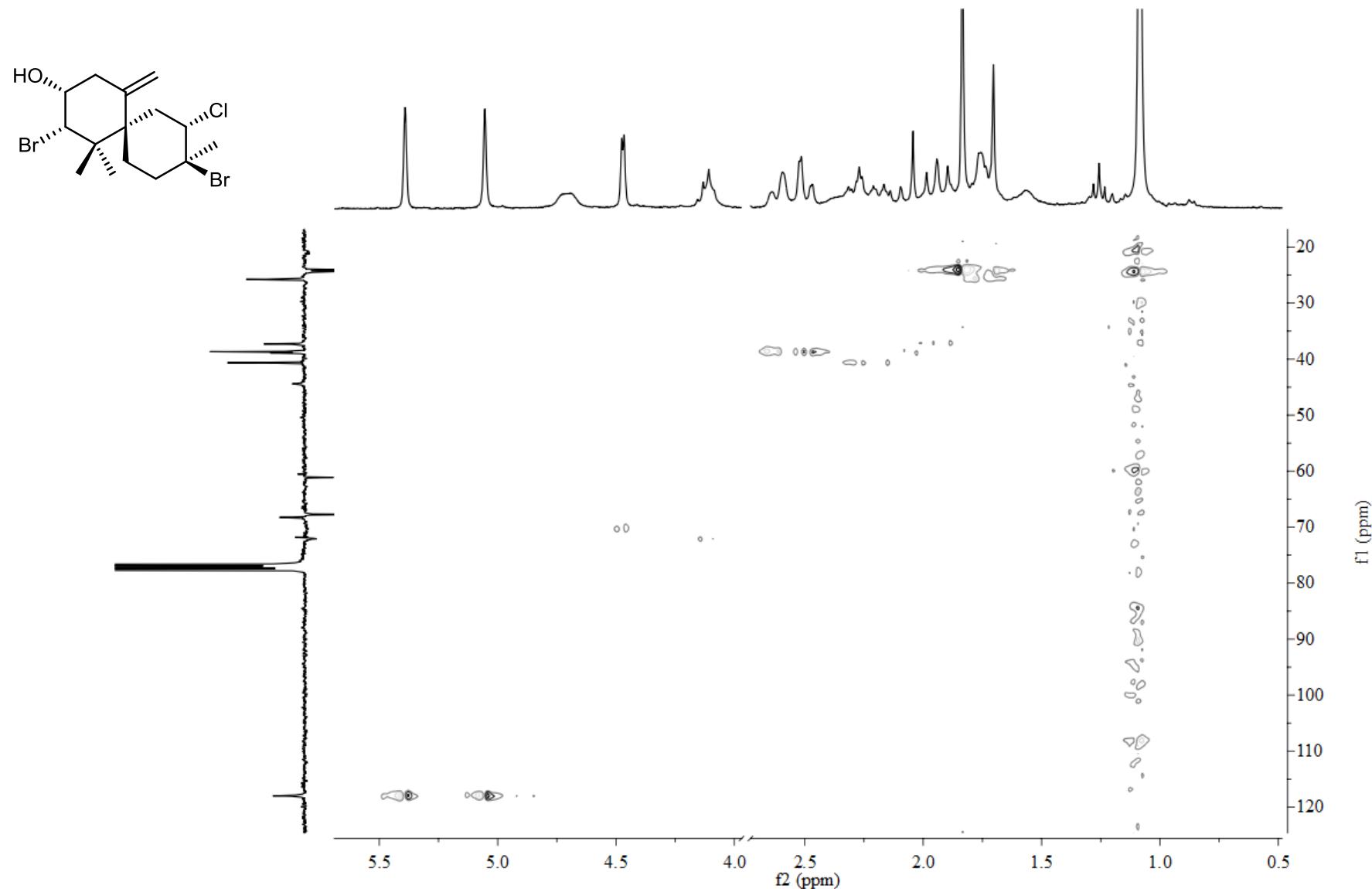
**APÊNDICE 30.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do obtusol



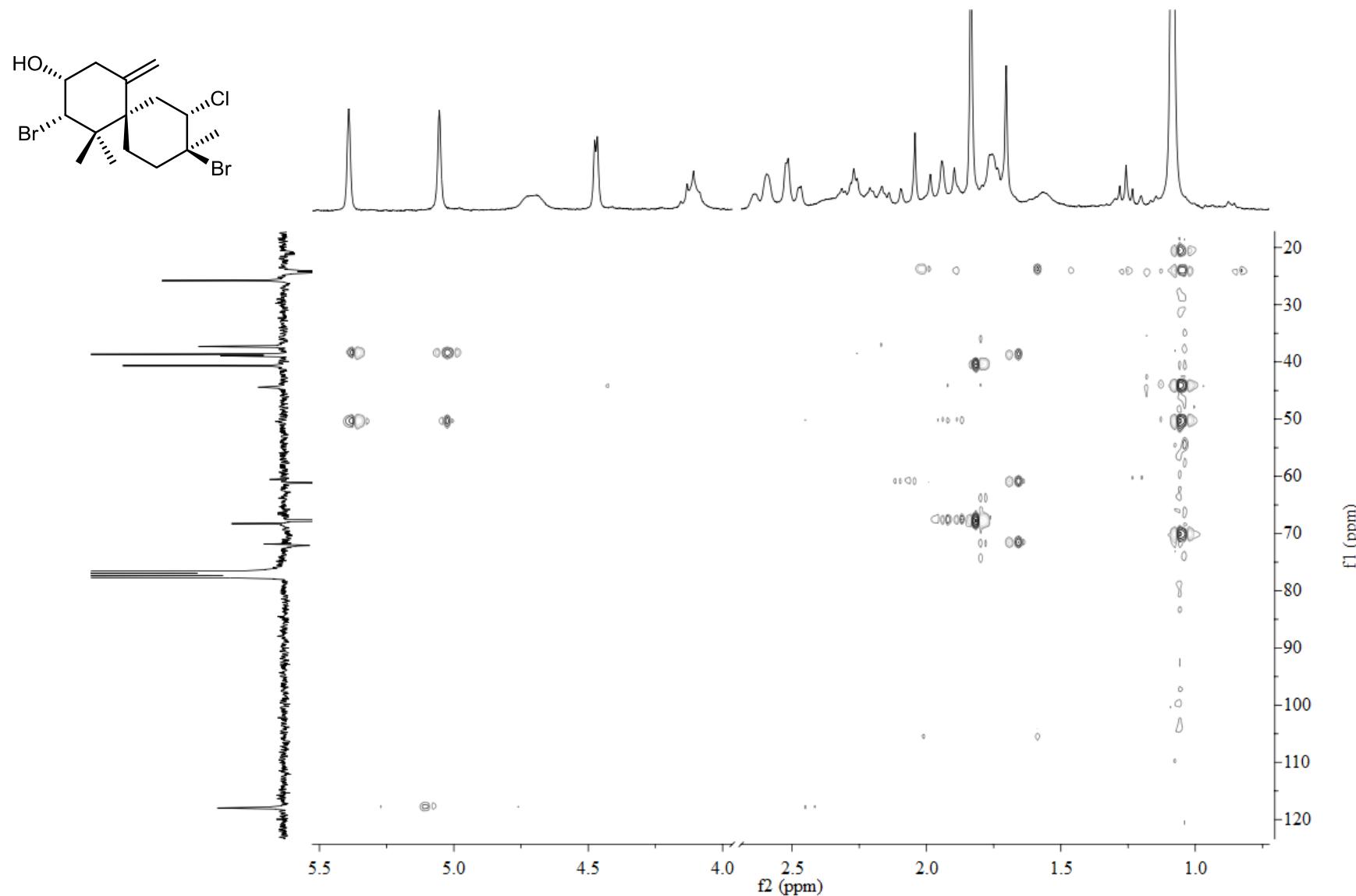
APÊNDICE 31. Espectro de RMN APT (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do obtusol



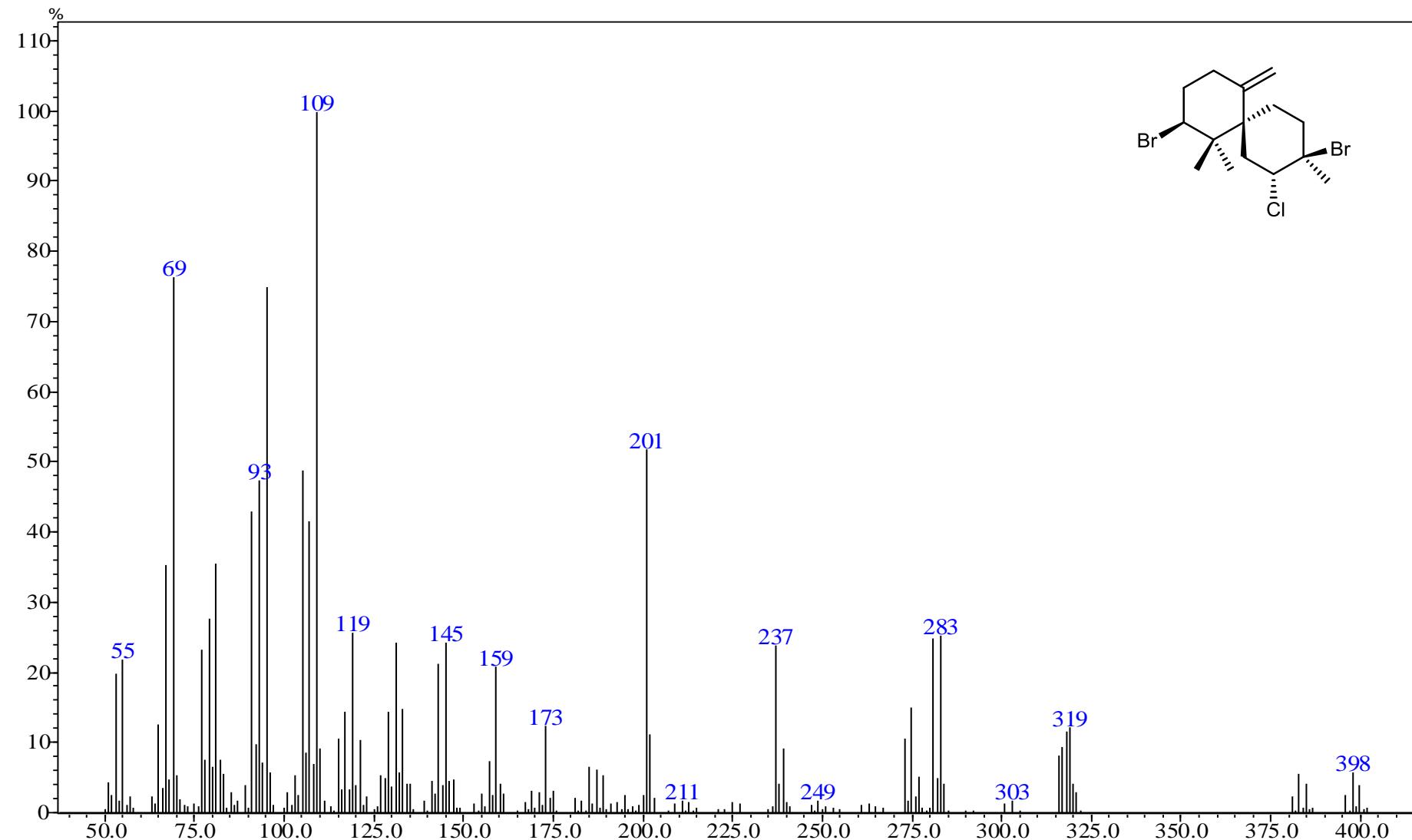
APÊNDICE 32. Espectro de RMN COSY (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do obtusol



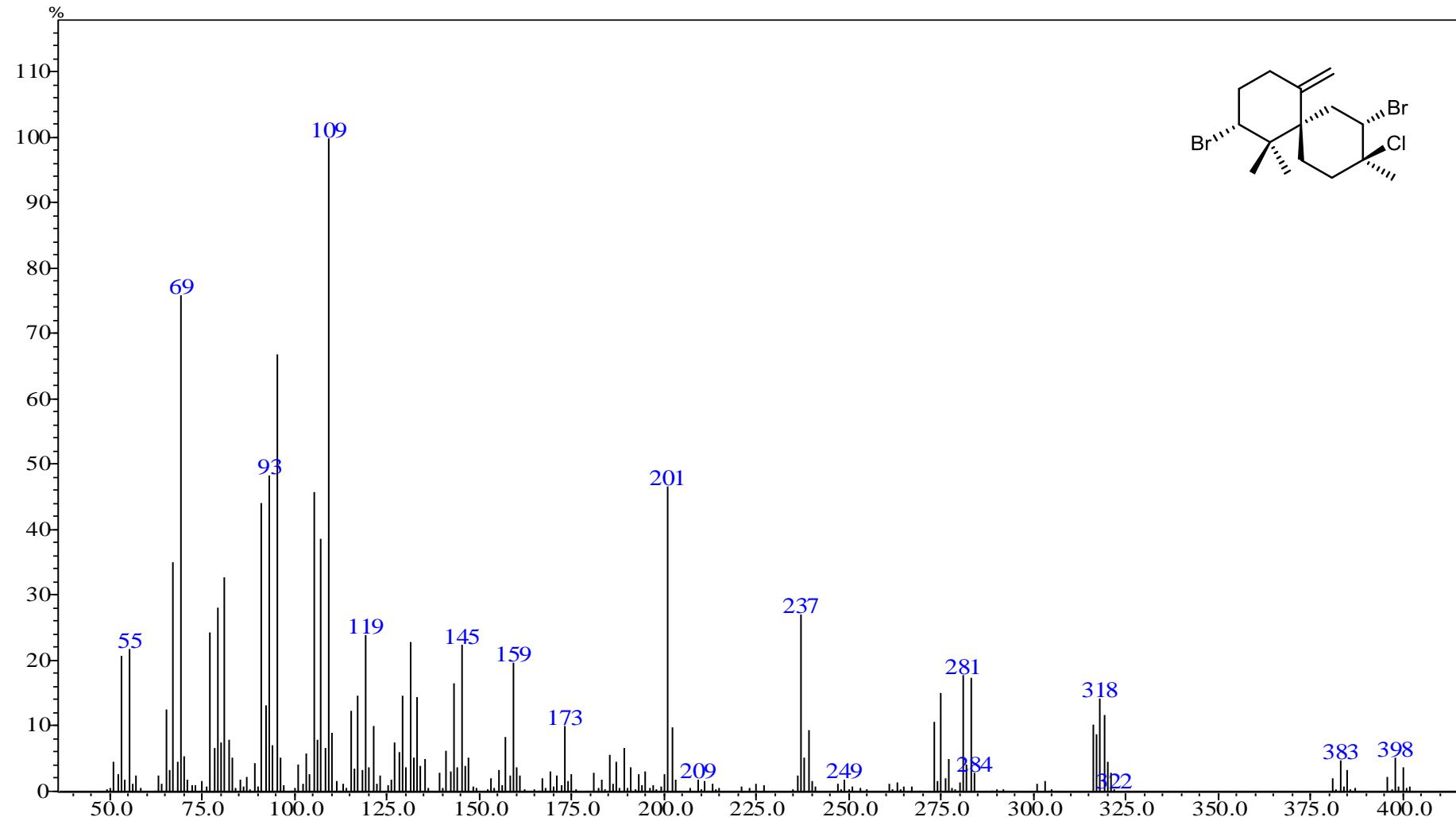
APÊNDICE 33. Espectro de RMN HSQC (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) do obtusol



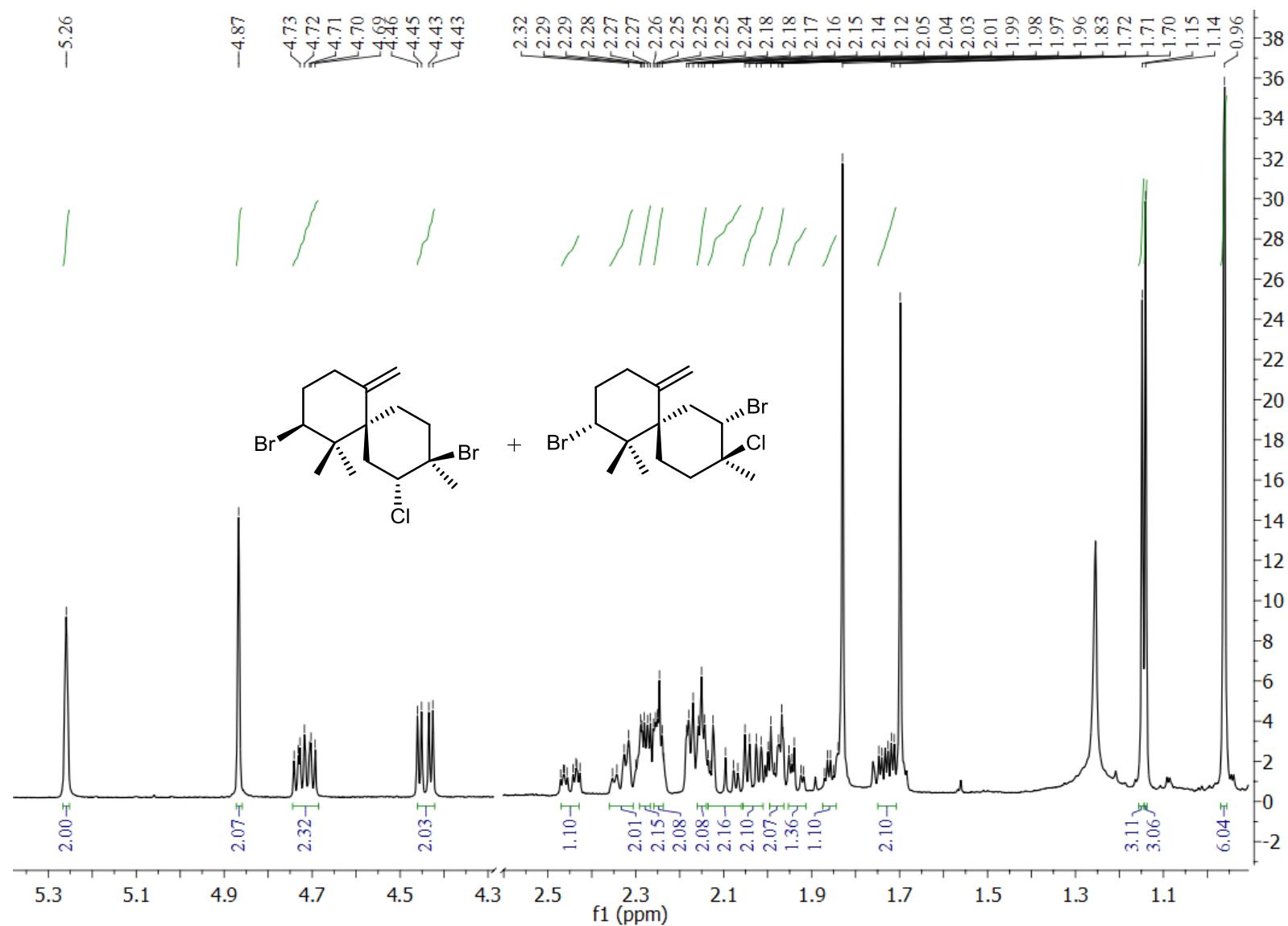
APÊNDICE 34. Espectro de RMN HMBC (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) do obtusol



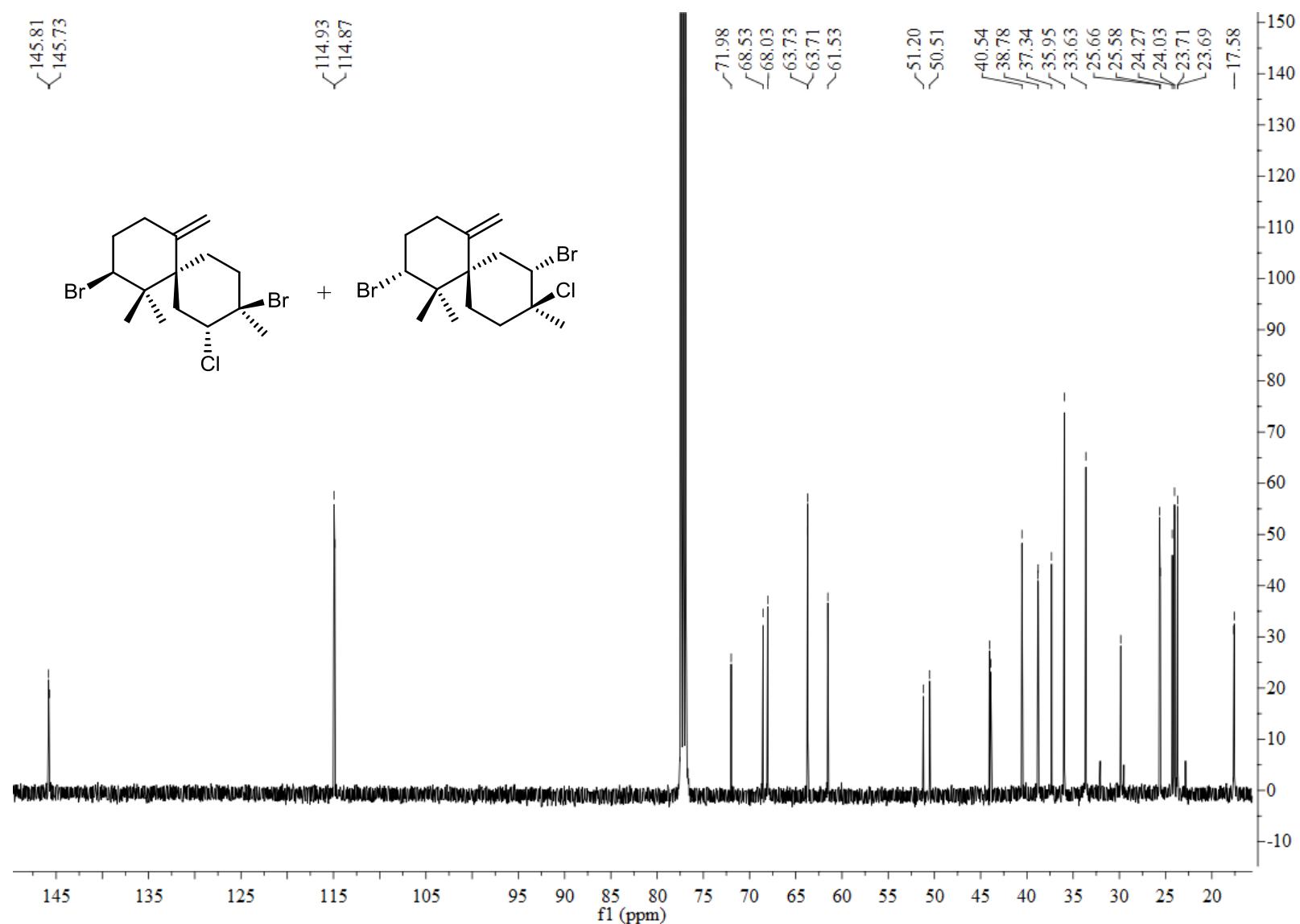
APÊNDICE 35. Espectro de massas por impacto de elétrons (70eV) do obtusano



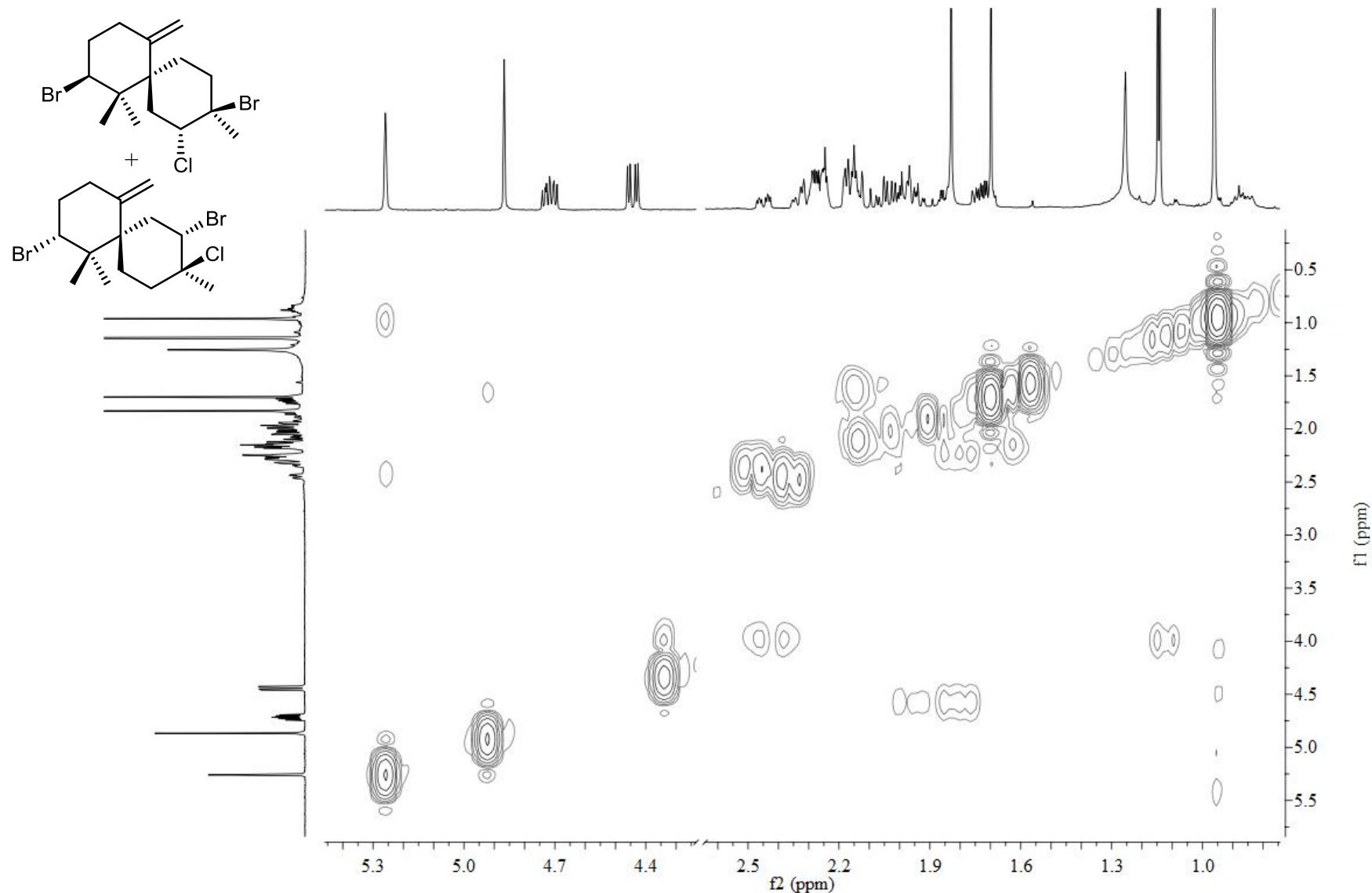
APÊNDICE 36. Espectro de massas por impacto de elétrons (70eV) do **nidificeno**



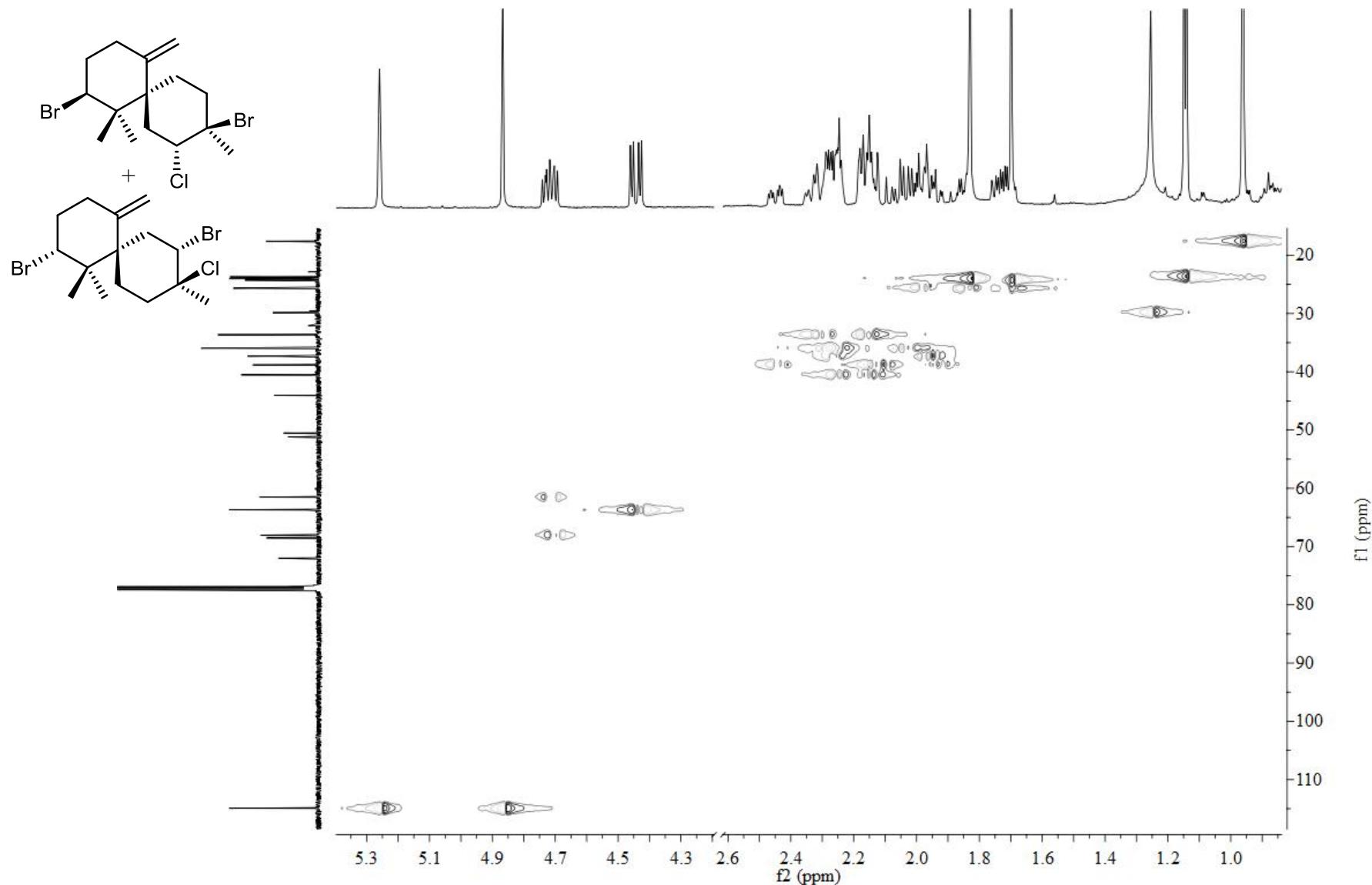
**APÊNDICE 37.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura: **obtusano + nidificeno**



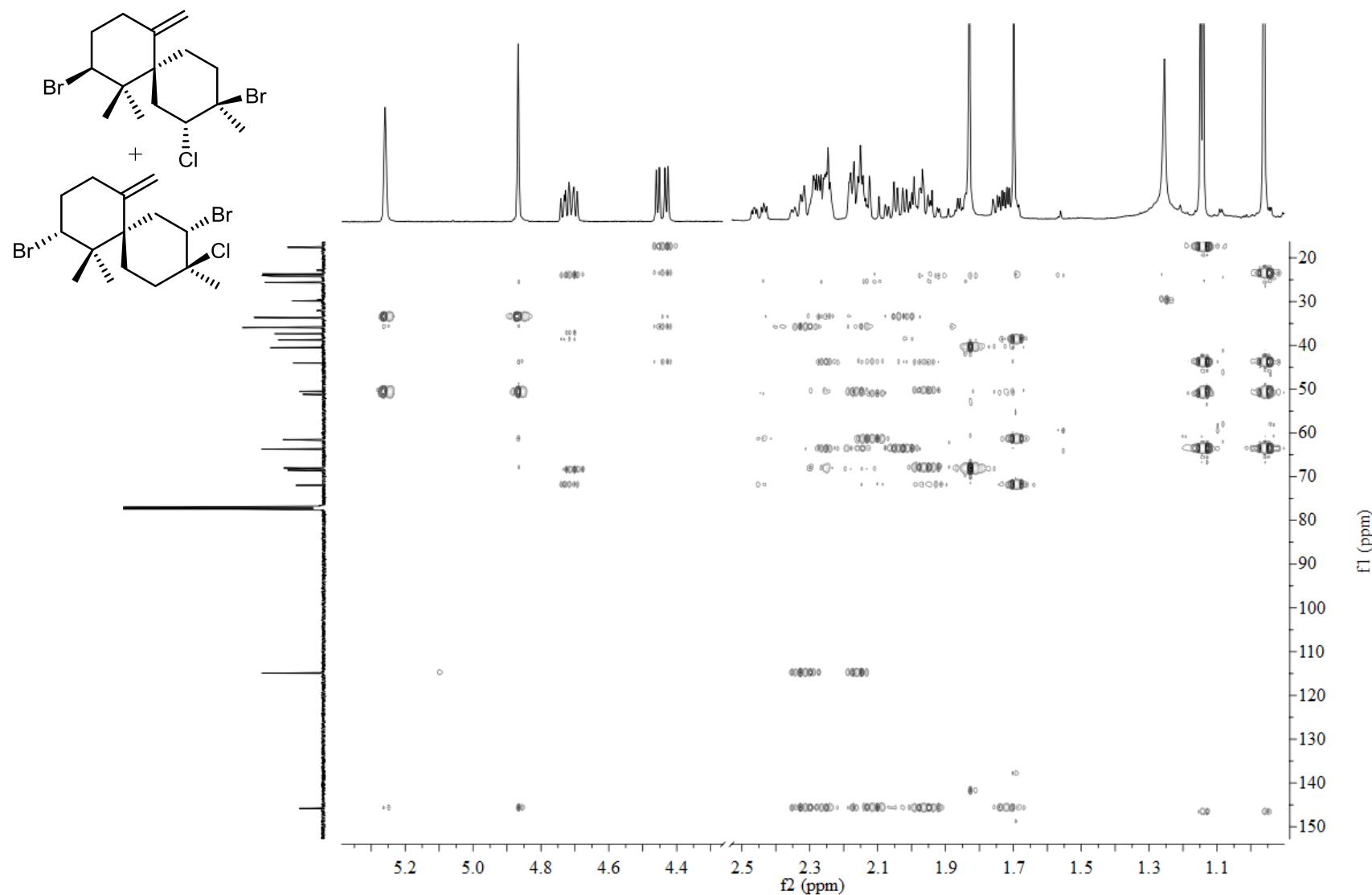
**APÊNDICE 38.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura: **obtusano + nidificeno**



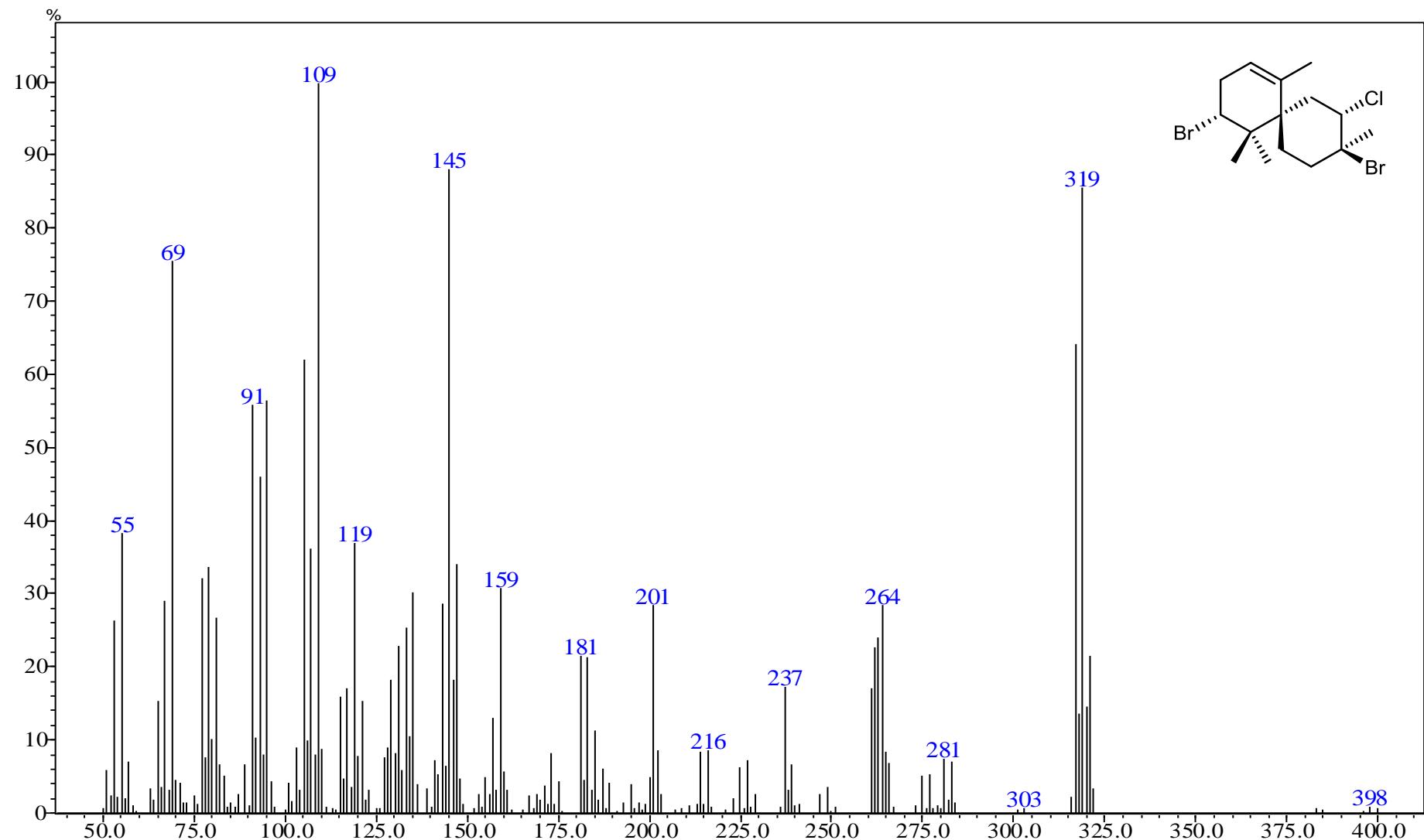
APÊNDICE 39. Espectro de RMN COSY (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura: **obtusano + nidificeno**)



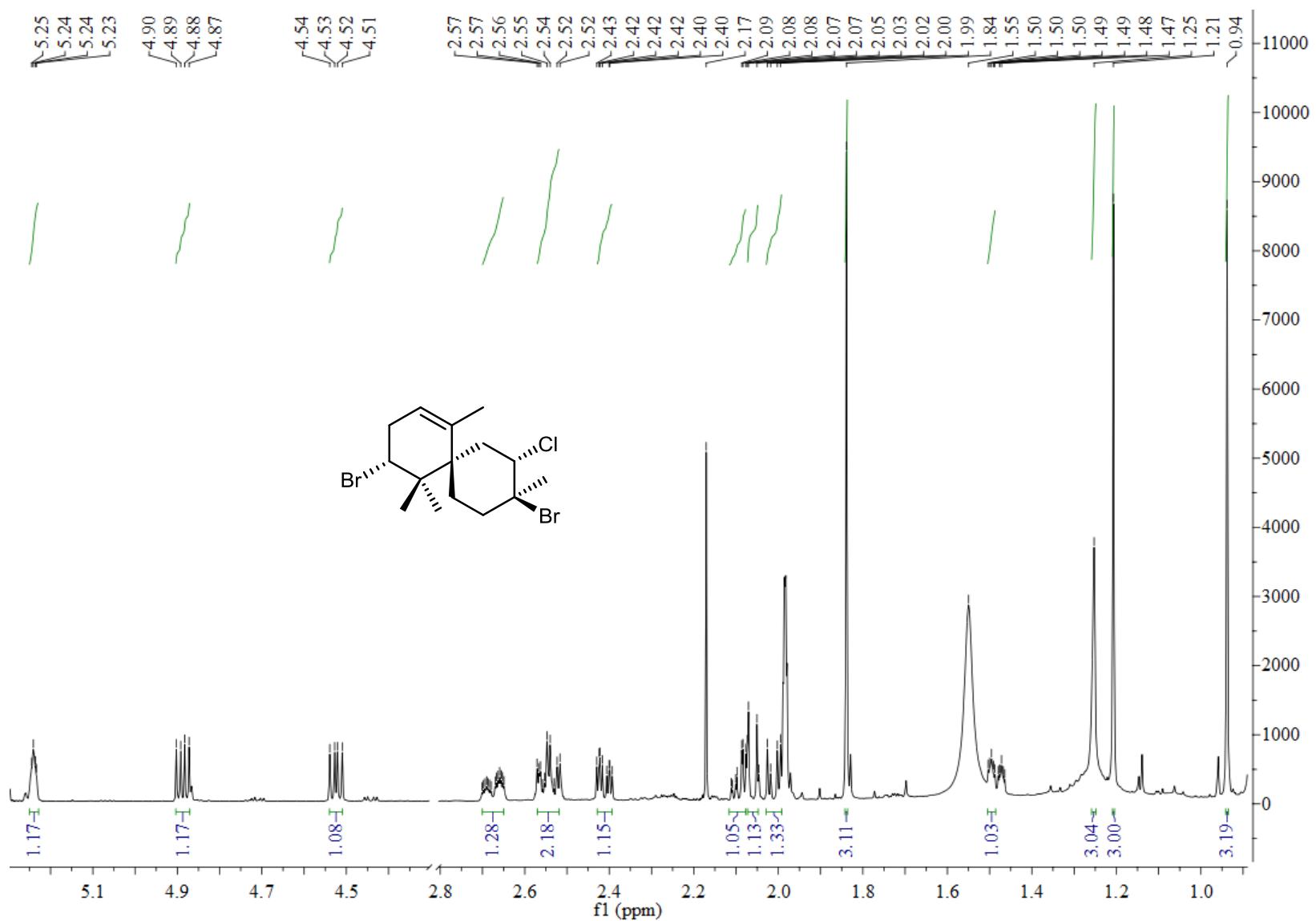
**APÊNDICE 40.** Espectro de RMN HSQC (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura: **obtusano + nidificeno**



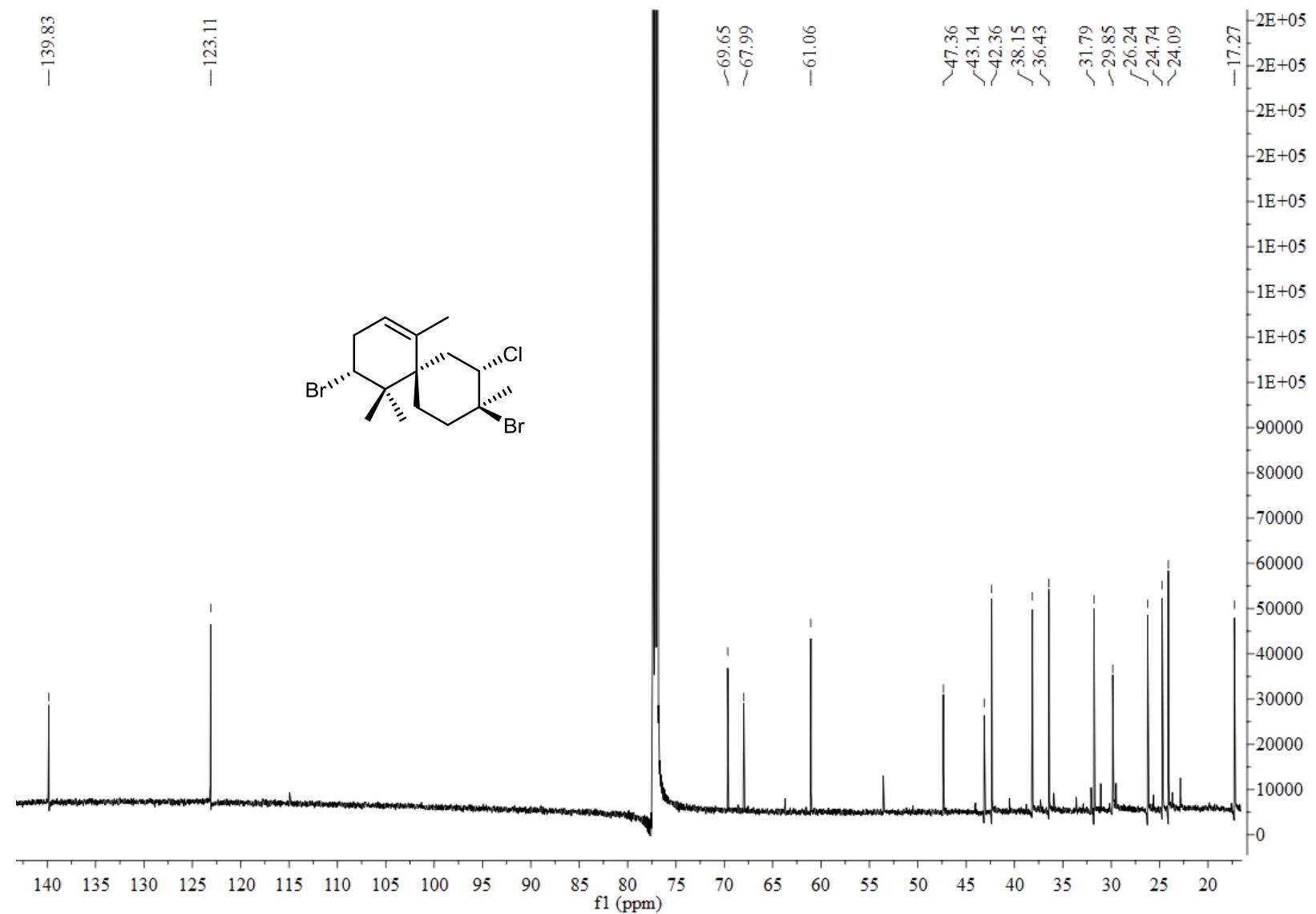
**APÊNDICE 41.** Espectro de RMN HMBC (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura: **obtusano + nidificeno**



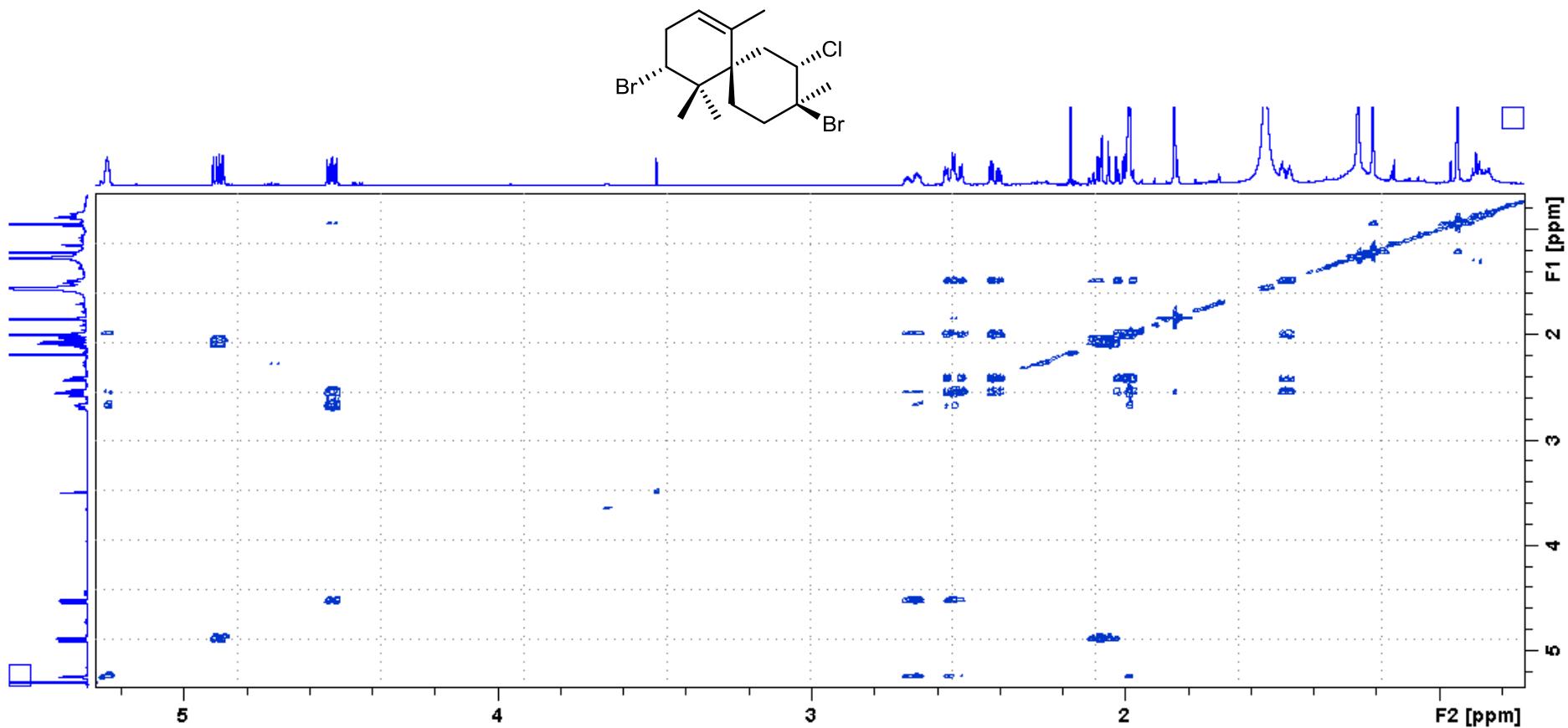
**APÊNDICE 42.** Espectro de massas por impacto de elétrons (70eV) da **3,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno**



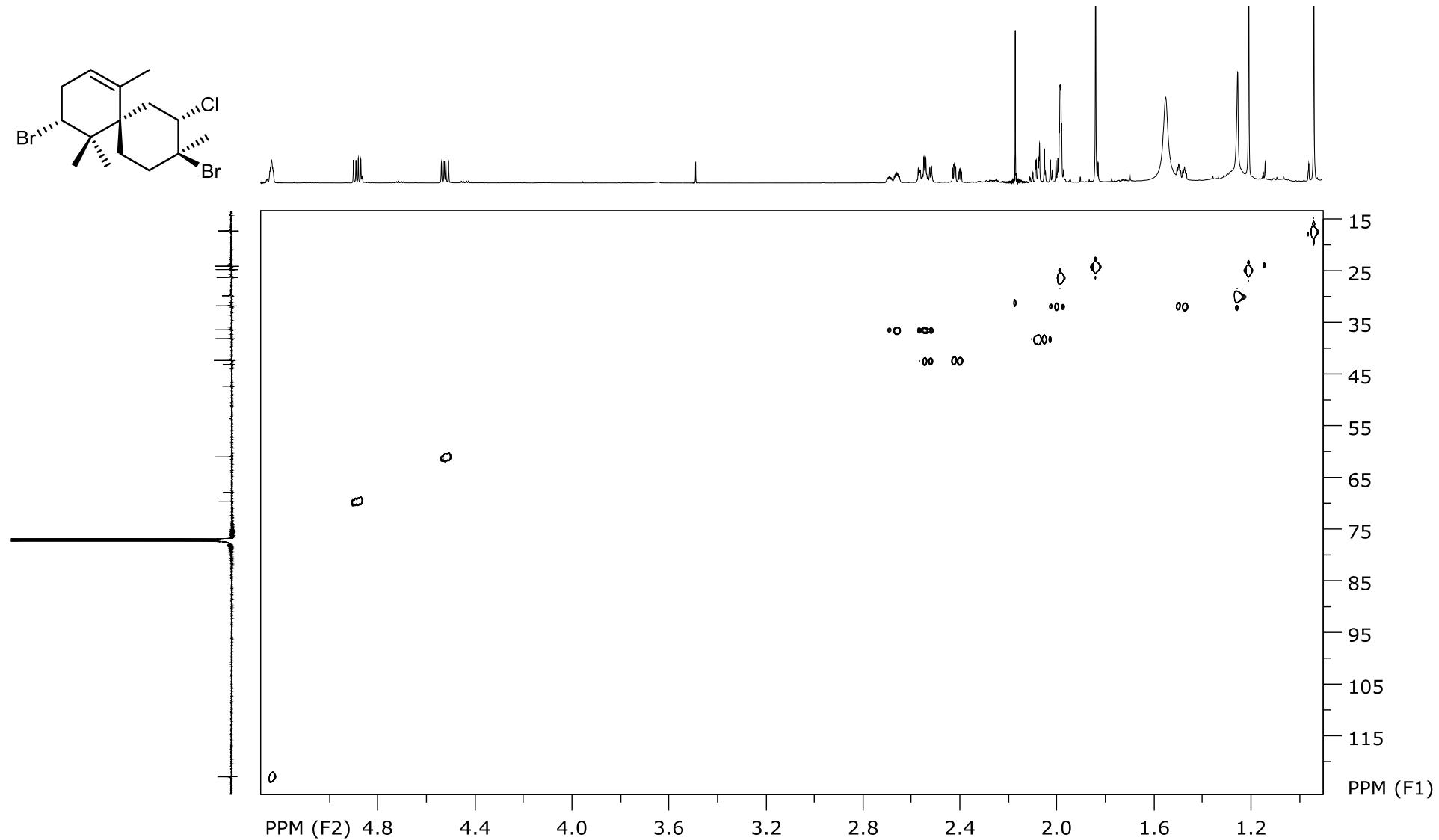
**APÊNDICE 43.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da **3,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno**



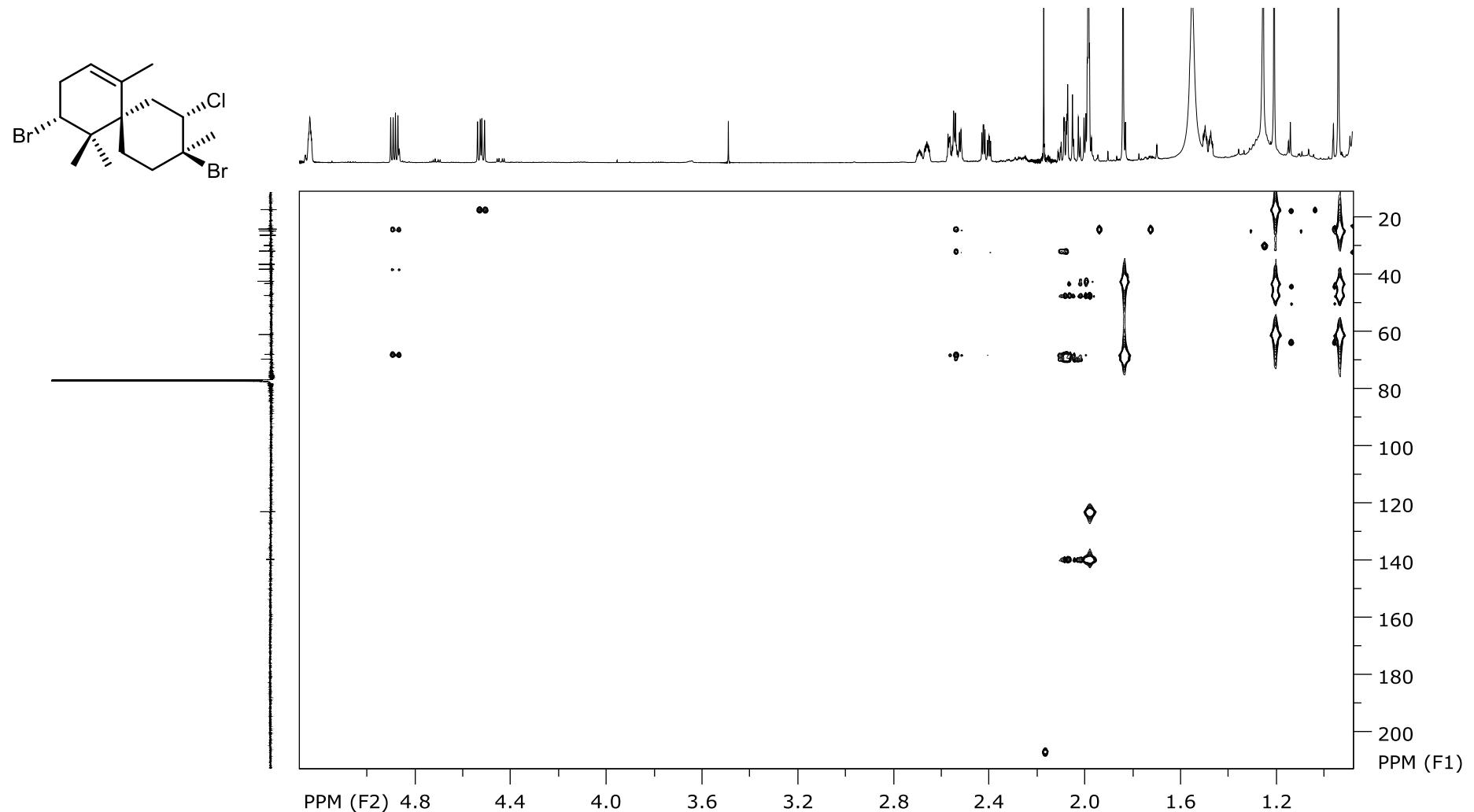
APÊNDICE 44. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 3,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno



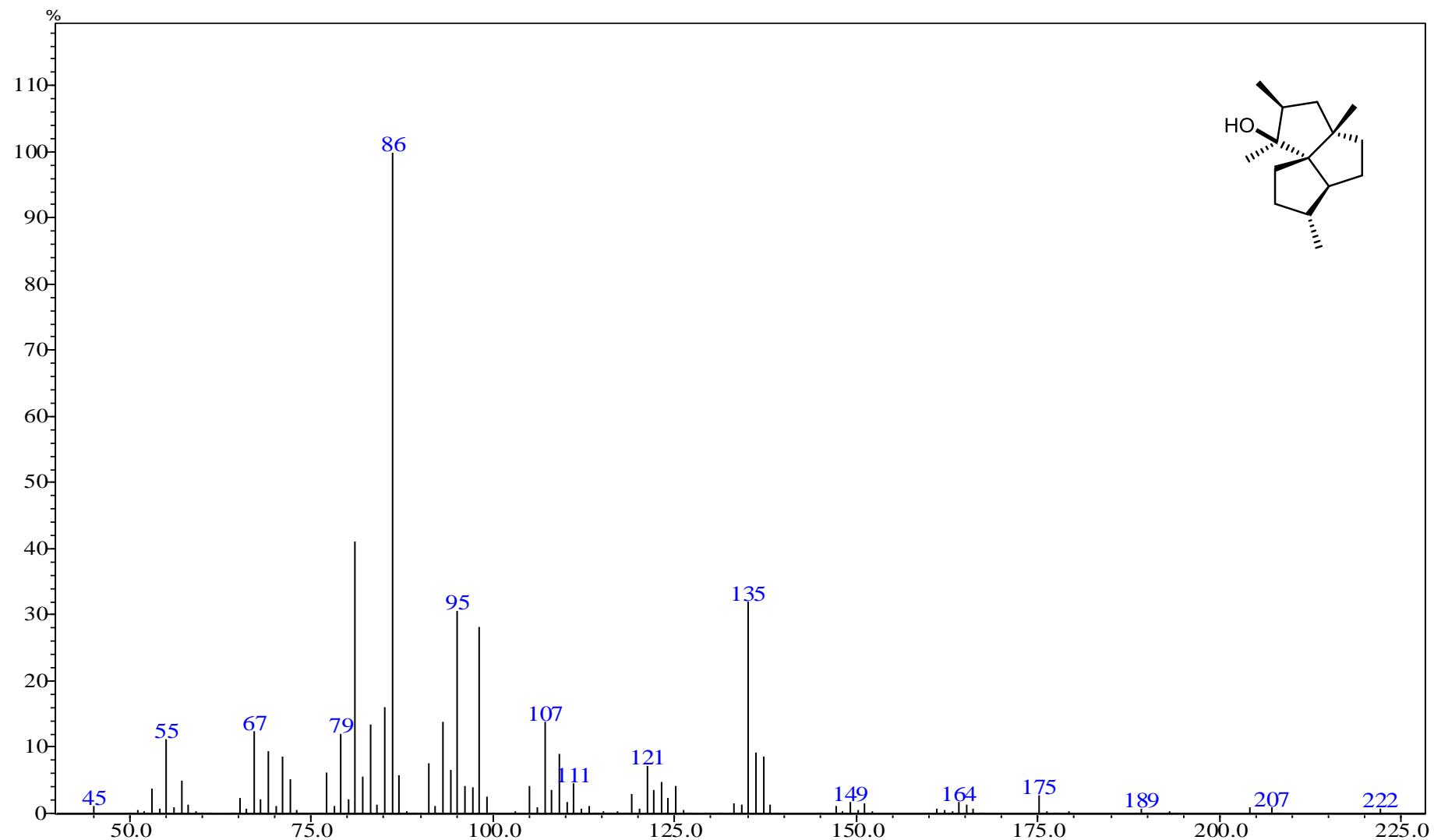
APÊNDICE 45. Espectro de RMN COSY (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 3,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno



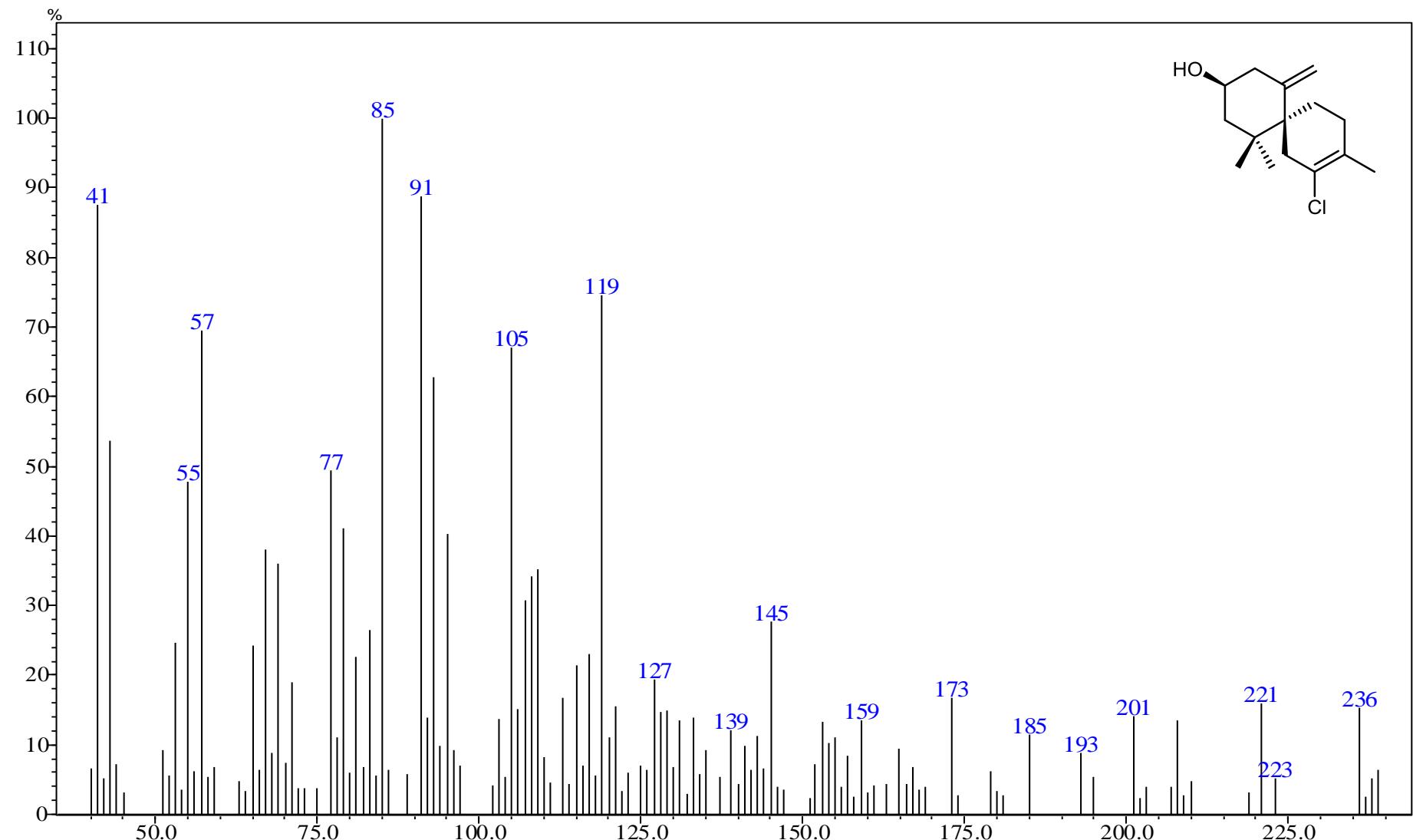
APÊNDICE 46. Espectro de RMN HSQC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da 3,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno



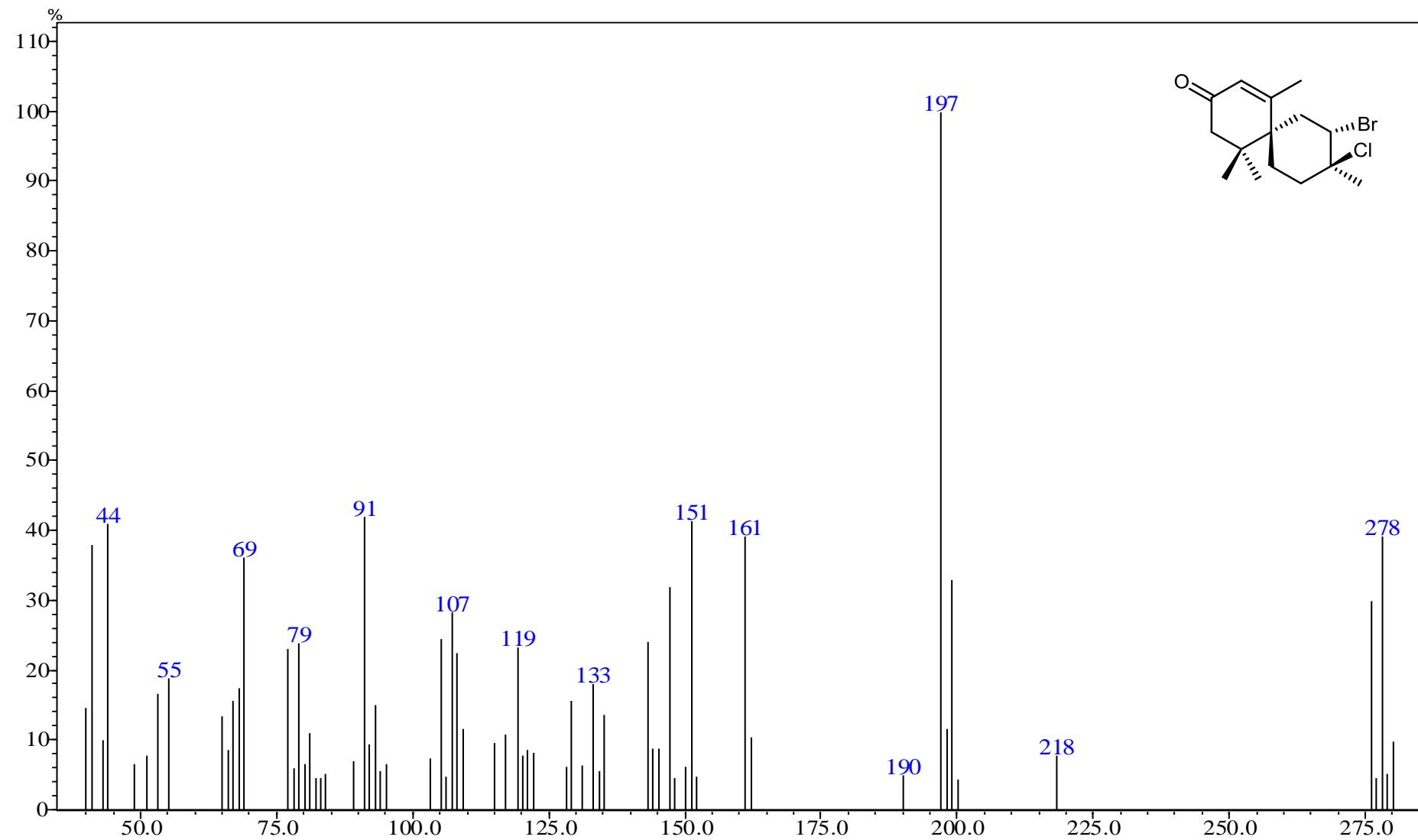
**APÊNDICE 47.** Espectro de RMN HMBC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da **3,10-dibromo-4-cloro- $\alpha$ -chamigreno**



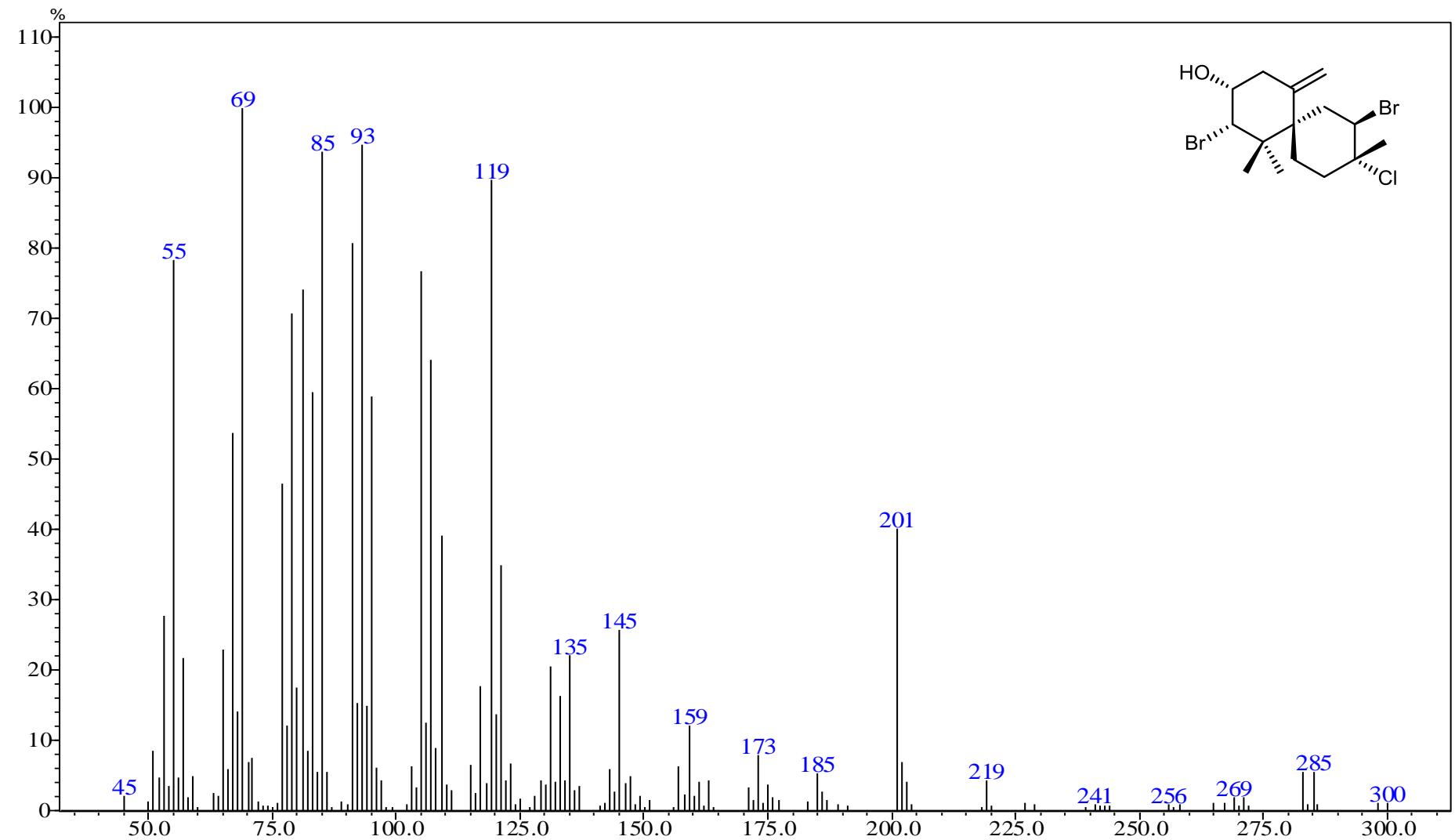
APÊNDICE 48. Espectro de massas por impacto de elétrons (70eV) do **triquinano**



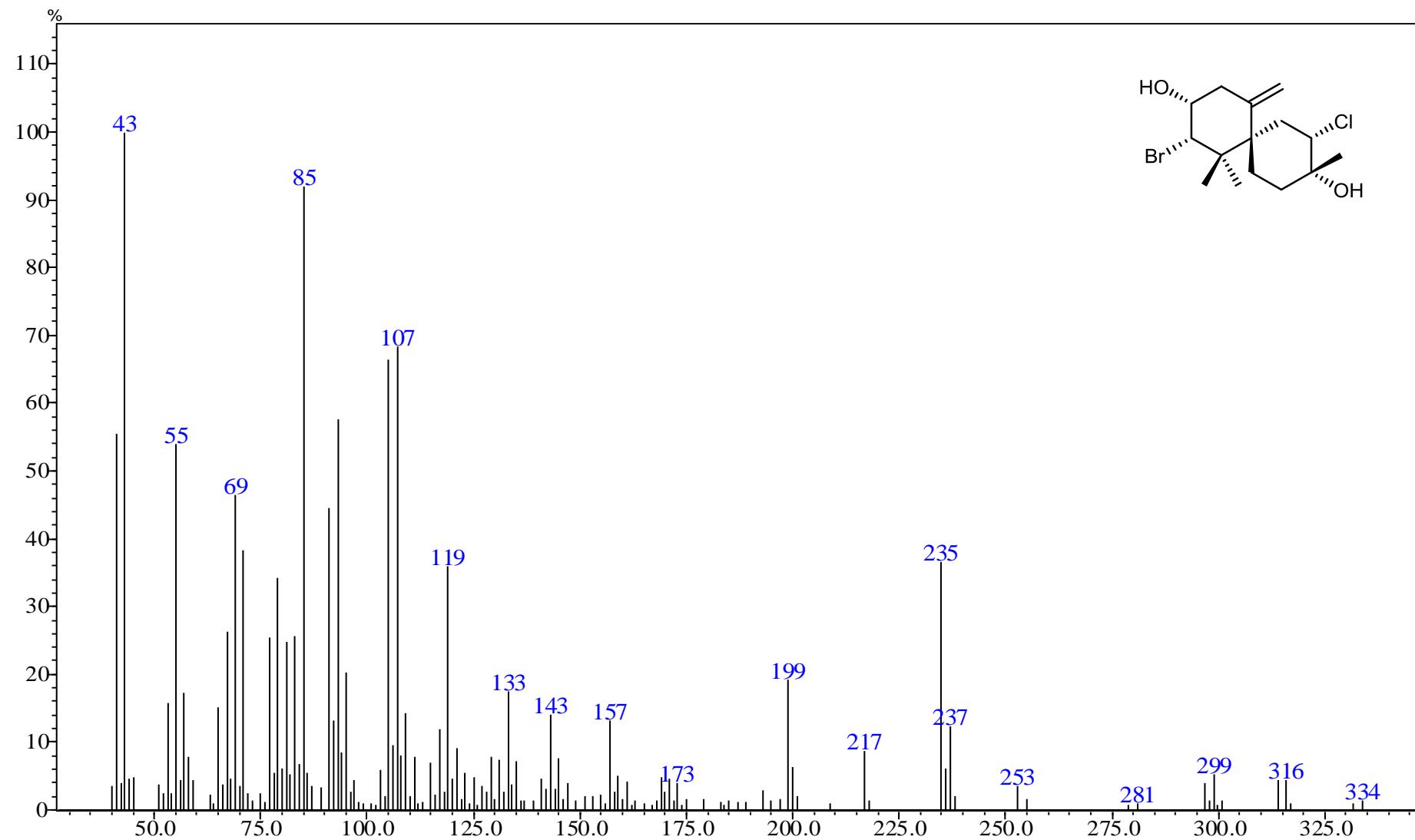
APÊNDICE 49. Espectro de massas por impacto de elétrons (70eV) do **debromoelatol**



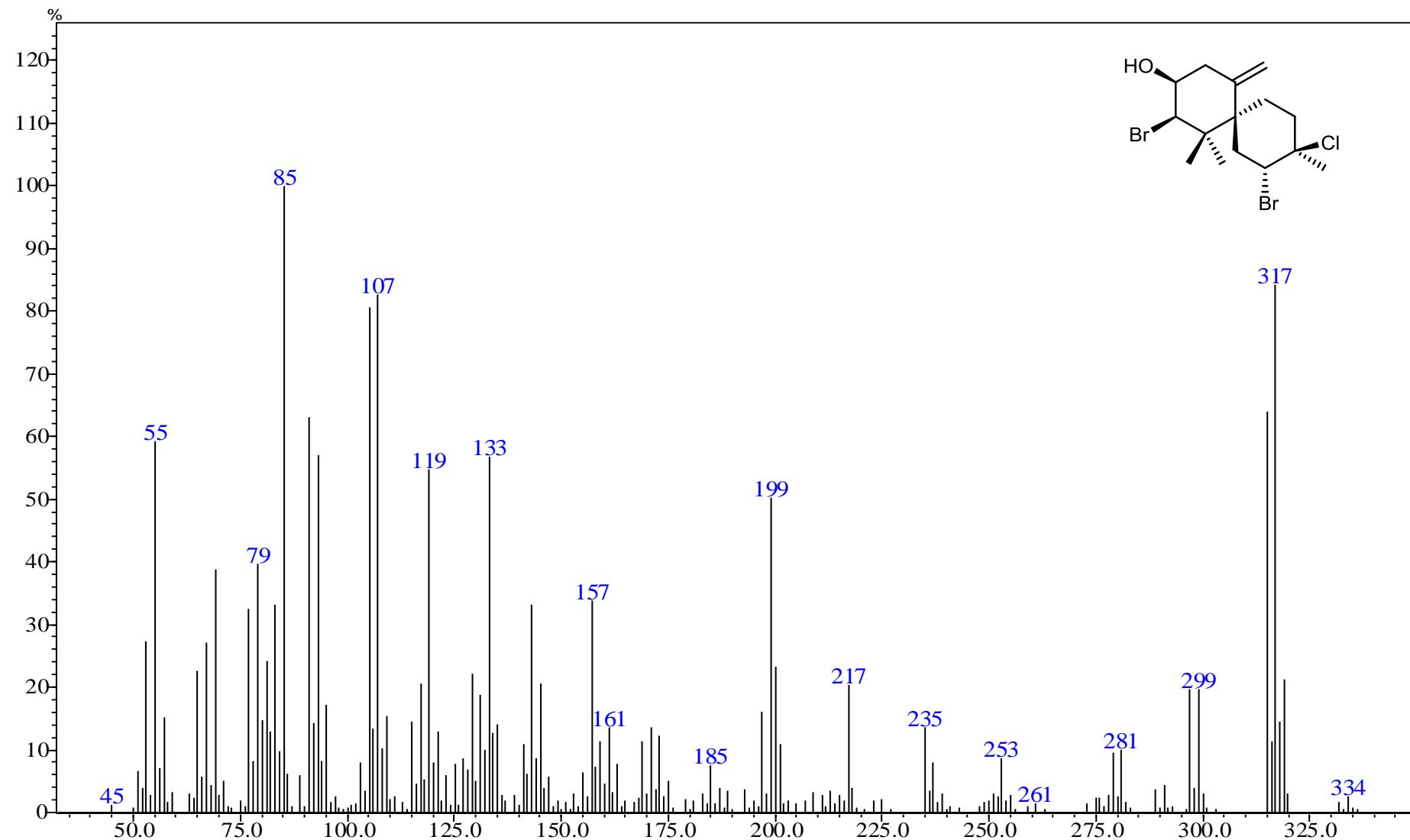
**APÊNDICE 50.** Espectro de massas por impacto de elétrons (70eV) do **enona do desbromocartilagineol ou laurencenone D**



APÊNDICE 51. Espectro de massas por impacto de elétrons (70eV) do **cartilagineol**



**APÊNDICE 52.** Espectro de massas por impacto de elétrons (70eV) do **dendroidiol**



APÊNDICE 53. Espectro de massas por impacto de elétrons (70eV) do **rogiolol**

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

# ANEXOS

*TESE*

Sinalização química mediando interações ecológicas entre a macroalga vermelha *Laurencia dendroidea* e seu herbívoro associado *Aplysia brasiliiana*

**NATHÁLIA PEIXOTO NOCCHI CARNEIRO**

NITERÓI – RJ

2017

**ANEXO 1.** Tabela e estruturas dos metabólitos em comuns isolados de espécies do gênero *Aplysia* e *Laurencia*. A classe química, as espécies biológicas de onde foram isolados e origem histológica de *Aplysia* são apresetados.

Nº	NOME	CLASSE	ESPÉCIE DE <i>Aplysia</i>	ORIGEM HISTOLOGICA EM <i>Aplysia</i>	ESPÉCIE DE <i>Laurencia</i> <sup>1</sup> (fonte de alimento para <i>Aplysia</i> spp.)
1	<b>2,10-dibromo-3-cloro-<math>\alpha</math>-chamigreno</b>	Sesquiterpeno	<i>A. parvula</i> <sup>2</sup>	indivíduo inteiro <sup>2</sup>	<i>L. claviformis</i> , <i>L. composita</i> , <i>L. filiformis</i> , <i>L. glomerata</i> , <i>L. implicata</i> , <i>L. japonensis</i> , <i>L. nangii</i> , <i>L. nidifica</i> , <i>L. nipponica</i> , <i>L. obtusa</i> , <i>L. okamurae</i> , <i>L. papillosa</i> , <i>L. scoparia</i> , <i>Laurencia</i> sp. cf. <i>L. gracilis</i> , <i>Laurencia</i> sp.
2	<b>9-acetoxi-3-cloro-4,10-dibromo-<math>\alpha</math>-chamigreno</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>3</sup>	-	<i>L. majuscula</i>
3	<b>2,10-dibromo-3-cloro-8-hidroxi-<math>\beta</math>-chamigreno</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>4</sup>	-	<i>L. nipponica</i>
4	<b>obtusol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>5,6</sup>	tecido do animal (não especificado), <sup>5</sup> manto <sup>6</sup>	<i>L. dendroidea</i> , <i>L. majuscula</i> , <i>L. obtusa</i> , <i>L. scoparia</i>
5	<b>nidificene</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>7</sup>	glândulas digestivas <sup>7</sup>	<i>L. compósita</i> , <i>L. mariannensis</i> , <i>L. nidifica</i> , <i>L. nipponica</i> , <i>L. obtusa</i> , <i>L. okamurae</i>

6	<b>cartilagineol ou (allo-isoobtusol)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>5</sup>	tecido do animal (não especificado) <sup>5</sup>	<i>L. cartilaginea, L. dendroidea, Laurencia sp.,</i>
7	<b>(Z)-10,15-dibromo-9- hidroxichamigra- 1,3(15),7(14)-trieno</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>8,9</sup>	trato digestivo, <sup>8</sup> glândulas digestivas <sup>9</sup>	<i>L. cartilaginea, L. majuscula, L. scoparia, Laurencia sp.,</i>
8	<b>(E)-10,15-dibromo-9- hidroxichamigra- 1,3(15),7(14)-trieno</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>8,9</sup>	trato digestivo, <sup>8</sup> glândulas digestivas <sup>9</sup>	<i>L. cartilaginea, L. majuscula, L. scoparia, Laurencia sp.,</i>
9	<b>rogiolol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. majuscula, L. microcladia, L. obtusa</i>
10	<b>isoobtusol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> , <sup>5,6</sup> <i>A. parvula</i> <sup>10</sup>	tecido do animal (não especificado), <sup>5</sup> glândulas digestivas, <sup>6</sup> trato digestivo <sup>10</sup>	<i>L. majuscula, L. obtusa</i>
11	<b>descloroelatol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>1</sup>	glândulas digestivas	<i>L. mariannensis, L. obtusa, L. rigida</i>
12	<b>elatol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> , <sup>5,6,8,9,11</sup> <i>A. parvula</i> <sup>10</sup>	Tecido do animal (não especificado), <sup>5</sup> glândulas digestivas, <sup>6,9</sup> trato digestivo, <sup>8,10</sup> indivíduo inteiro <sup>11</sup>	<i>L. cartilaginea, L. chondrioides, L. decumbens, L. dendroidea, L. elata, L. majuscula, L. mariannensis, L. microcladia, L. obtusa, L. pacifica, L. rigida, L. scoparia</i>
13	<b>(8R,9R)-8-bromo-9-cloro 5,5,9- trimetilimetilidenespiro[5, 5]undec-3-en-2-ona</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>12</sup>	glândulas digestivas <sup>12</sup>	<i>L. majuscula</i>

---

	<b>(4-bromo-3-cloro-3,7,7-trimetil-10-oxospiro[5.5]undec-8-il-acetato)</b>				
14		Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>12</sup>	glândulas digestivas <sup>12</sup>	<i>L. majuscula, L. mariannensis</i>
16	<b>epóxido de dehidroxiprepacifenol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>13</sup>	-	<i>L. nidifica</i>
16	<b>epóxido de prepacifenol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. californica</i> , <sup>14,15</sup> <i>A. dactylomela</i> <sup>7,13</sup>	glândulas digestivas <sup>7,13,15</sup>	<i>L. composita, L. johnstonii, L. nidifica, L. okamurae, Laurencia sp.</i>
17	<b>deoxiprepacifenol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. californica</i> , <sup>15</sup> <i>A. parvula</i> <sup>50</sup>	glândulas digestivas, <sup>15</sup> indivíduo inteiro <sup>50</sup>	<i>L. caduciramulosa, L. claviformis, L. composita, L. elata, L. filiformis, L. majuscula, L. mariannensis, L. nangii, L. nidifica, L. nipponica, L. okamurae, L. pacifica, Laurencia sp. cf. L. gracilis</i>
18	<b>5-acetoxi-2,10-dibromo-3-cloro-7,8-epoxi-<math>\alpha</math>-chamigrano</b>	Sesquiterpeno	<i>A. parvula</i> <sup>50</sup>	indivíduo inteiro <sup>50</sup>	<i>L. filiformis</i>
19	<b>(Z)-9,15-dibromo-1,3(15)-chamigra-dieno-11-ol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>5,16</sup>	indivíduo inteiro, <sup>5</sup> glândulas digestivas <sup>16</sup>	<i>L. microcladia</i>
20	<b>(E)-9,15-dibromo-1,3(15)-chamigra-dieno-11-ol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>16</sup>	glândulas digestivas <sup>16</sup>	<i>L. microcladia</i>
21	<b>pacifidieno</b>	Sesquiterpeno	<i>A. californica</i> , <sup>17,18</sup>	glândulas digestivas <sup>17,18</sup>	<i>L. pacifica</i>

---

---

			<i>A. dactylomela</i> <sup>19</sup>		
22	<b>pacifinediol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. californica</i> , <sup>14,15</sup> <i>A. dactylomela</i> <sup>19</sup>	glândulas digestivas <sup>14,15</sup>	<i>L. composita</i> , <i>L. nidifica</i>
23	<b>pacifenol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. californica</i> , <sup>18</sup> <i>A. dactylomela</i> <i>asymmetrica</i> , <sup>1</sup> <i>A. dactylomela</i> , <sup>19</sup> <i>A. parvula</i> <sup>50</sup>	glândulas digestivas, <sup>18</sup> indivíduo inteiro <sup>50</sup>	<i>L. caduciramulosa</i> , <i>L. claviformis</i> , <i>L. composita</i> , <i>L. elata</i> , <i>L. filiformis</i> , <i>L. majuscula</i> , <i>L. mariannensis</i> , <i>L. nidifica</i> , <i>L. nipponica</i> , <i>L. okamurai</i> , <i>L. pacifica</i> , <i>L. tasmanica</i> , <i>Laurencia sp.</i> cf. <i>L. gracilis</i> , <i>Laurencia sp.</i>
24	<b>johnstonol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. californica</i> , <sup>14</sup> , <i>A. dactylomela</i> <sup>19</sup>	glândulas digestivas <sup>14</sup>	<i>L. composita</i> , <i>L. johnstonii</i> , <i>L. nidifica</i> , <i>L. okamurai</i> , <i>L. pacifica</i> , <i>L. tristicha</i>
25	<b>ma'llione</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. cartilaginea</i> , <i>L. majuscula</i> , <i>L. scoparia</i> , <i>Laurencia sp.</i>
26	<b>laureno</b>	Sesquiterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. elata</i> , <i>L. filiformis f. heteroclada</i> , <i>L. glandulifera</i> , <i>L. nipponica</i> , <i>L. okamurai</i> , <i>L. subopposita</i> , <i>Laurencia sp.</i> cf. <i>L. gracilis</i>
27	<b>debromoallolaurinterol ou (7-hidroxi-laureno)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. caduciramulosa</i> , <i>L. nipponica</i> , <i>L. obtusa</i> , <i>L. okamurai</i> , <i>L. subopposita</i>

---

---

28	<b>lalolaurinterol ou (10-bromo-7-hidroxi-laureno)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>11,21</sup>	indivíduo inteiro <sup>11,21</sup>	<i>L. caduciramulosa, L. caraibica, L. filiformis f. heteroclada, L. glandulifera, L. majuscula, L. obtusa, L. subopposita</i>
29	<b>acetato de allolaurinterol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>9,21</sup>	glândulas digestivas, <sup>9</sup> indivíduo inteiro <sup>21</sup>	<i>L. okamurae</i>
30	<b>isolaurinterol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>22</sup>	indivíduo inteiro <sup>22</sup>	<i>L. decidua, L. filiformis f. heteroclada, L. nidifica, L. okamurae, L. pacifica, L. tristicha</i>
31	<b>laurenisol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. claviformis, L. filiformis f. heteroclada, L. glandulifera, L. nipponica</i>
32	<b>isolaurenisol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>21</sup>	indivíduo inteiro <sup>21</sup>	<i>L. distichophylla</i>
33	<b>debromoaplisina</b>	Sesquiterpeno	<i>A. californica</i> , <sup>18</sup> <i>A. kurodai</i> <sup>23</sup>	glândulas digestivas, <sup>18</sup> indivíduo inteiro <sup>23</sup>	<i>L. distichophylla, L. nidifica, L. okamurae, L. pacifica, L. tristicha</i>
34	<b>aplisina</b>	Sesquiterpeno	<i>A. californica</i> , <sup>18</sup> <i>A. kurodai</i> , <sup>23</sup> <i>A. parvula</i> <sup>15</sup> [291];	glândulas digestivas, <sup>18</sup> indivíduo inteiro <sup>23,15</sup>	<i>L. decidua, L. nidifica, L. okamurae, L. pacifica, L. tristicha</i>
35	<b>aplinol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. kurodai</i> <sup>23</sup>	indivíduo inteiro <sup>23</sup>	<i>L. decidua, L. okamurae, L. pacifica, L. tristicha</i>
36	<b>isofiliformina</b>	Sesquiterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. glandulifera, L. pinnatifida</i>

---

---

37	<b>debromolaurinterol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. californica</i> , <sup>18</sup> <i>A. kurodai</i> , <sup>24</sup> <i>A. parvula</i> <sup>25</sup>	glândulas digestivas, indivíduo inteiro <sup>24,25</sup>	<i>L. decidua</i> , <i>L. flexilis</i> , <i>L. nidifica</i> , <i>L. okamurai</i> , <i>L. pacifica</i> , <i>L. tristicha</i>
38	<b>acetate de debromolaurinterol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. kurodai</i> <sup>26</sup>	indivíduo inteiro <sup>26</sup>	<i>L. okamurai</i>
39	<b>laurinterol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. californica</i> , <sup>18</sup> <i>A. dactylomela</i> , <sup>22</sup> <i>A. kurodai</i> , <sup>24</sup> <i>A. parvula</i> , <sup>25</sup> <i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	glândulas digestivas, <sup>18</sup> indivíduo inteiro <sup>25,20,22,24</sup>	<i>L. decidua</i> , <i>L. microcladia</i> , <i>L. nidifica</i> , <i>L. okamurai</i> , <i>L. pacifica</i> , <i>L. tristicha</i> , <i>Laurencia sp.</i>
40	<b>acetate de laurinterol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. kurodai</i> <sup>26</sup>	indivíduo inteiro <sup>26</sup>	<i>L. okamurai</i>
41	<b>ciclolaurenol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>27</sup>	indivíduo inteiro <sup>27</sup>	<i>L. calliclada</i> , <i>L. venusta</i>
42	<b>laurokamureno A</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. microcladia</i> , <i>L. okamurai</i> , <i>Laurencia sp.</i>
43	<b>β-sniderol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. obtusa</i> , <i>L. snyderae</i>
44	<b>3,3-dimetil-5-metileno-4 (3-metilpenta-2,4-dienil) ciclohexano-1-eno</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. implicata</i> , <i>L. snackeyi</i>

---

45	<b>palisol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. flexilis, L. implicata, L. luzonensis, L. snackeyi</i>
46	<b>palisadina B</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. flexilis, L. implicata, L. karlae, L. luzonensis, L. saitoi, L. similis, L. snackeyi</i>
47	<b>5β-acetoxi-palisadina B</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. flexilis, L. karlae, L. saitoi, L. similis, L. snackeyi</i>
48	<b>12-hidroxi-palisadina B</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>1</sup>		<i>L. flexilis, L. karlae, L. snackeyi</i>
49	<b>12-Acetoxi-palisadina B</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. snackeyi</i>
50	<b>aplisistatina</b>	Sesquiterpeno	<i>A. angasi</i> , <sup>1</sup> <i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. filiformis, L. flexilis, L. implicata, L. karlae, L. luzonensis, L. saitoi, L. similis, L. snackeyi, C. papillosum</i>
51	<b>palisadina A</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> , <sup>8</sup> <i>A. parvula</i> <sup>10</sup>	trato digestivo <sup>8,10</sup>	<i>L. flexilis, L. implicata, L. karlae, L. luzonensis, L. saitoi, L. similis, L. snackeyi</i>
52	<b>dactilenol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>28</sup>	-	<i>L. intricata</i>
53	<b>(1R, 2S, 6S) -2- (3-hidroxi-3-metilpent-4-en-1-il) -1,3,6-trimetilciclo-hex-3-en-1-ol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. nangii</i>

---

	<b>(1R, 2S, 6R) -2- (3-hidroxi-3-metilpent-4-en-1-il) -1,3,6-trimetilciclo-hex-3-en-1-ol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. nangii</i>
54	<b>dactiloxeno A</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>28</sup>	-	<i>L. nangii</i>
55	<b>caespitano (deoxicaespitol)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>5,6</sup>	tecido do animal (não especificado), <sup>5</sup> glândulas digestivas <sup>6</sup>	<i>L. caespitosa, L. catarinensis</i>
56	<b>caespitol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>5,29</sup>	tecido do animal (não especificado), <sup>5</sup> glândulas digestivas, <sup>29</sup> manto <sup>29</sup>	<i>L. aldingensis, L. caespitosa, L. caespitosa, L. catarinensis, L. intricata, L. obtusa</i>
57	<b>8-acetylcaespitol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>5,29</sup>	tecido do animal (não especificado), <sup>5</sup> glândulas digestivas, <sup>29</sup> manto <sup>29</sup>	<i>L. catarinensis</i>
58	<b>caespitenano</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>5,6</sup>	tecido do animal (não especificado), <sup>5</sup> glândulas digestivas <sup>6</sup>	<i>L. catarinensis</i>
59	<b>furocaespitano</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>5,29</sup>	tecido do animal (não especificado), <sup>5</sup> glândulas digestivas, <sup>29</sup> manto <sup>29</sup>	<i>L. caespitosa</i>
60	<b>furocaespitanelactol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>29</sup>	glândulas digestivas, <sup>29</sup>	<i>L. catarinensis</i>

---

---

				manto <sup>29</sup>	
62	<b>laucapiranoide A</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>5,29</sup>	tecido do animal (não especificado), <sup>5</sup> glândulas digestivas <sup>29</sup>	<i>L. caespitosa</i>
63	<b>perforenono</b>	Sesquiterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. obtusa, L. perforata, L. snyderae var. guadalupensis</i>
64	<b>brasilenol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. brasiliiana</i> <sup>30</sup> <i>A. dactylomela</i> , <sup>31</sup> <i>A. fasciata</i> <sup>32</sup>	glândulas digestivas, <sup>30,31</sup> glândulas digestivas e hermafrodita <sup>32</sup>	<i>L. implicata, L. obtusa</i>
65	<b>epibrasilenol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. brasiliiana</i> , <sup>30</sup> <i>A. fasciata</i> <sup>32</sup>	glândulas digestivas, <sup>30</sup> glândulas digestivas e hermafrodita <sup>32</sup>	<i>L. obtusa</i>
66	<b>4-hidroxi-5-brasileno</b>	Sesquiterpeno	<i>A. fasciata</i> <sup>32</sup>	glândulas digestivas e hermafrodita <sup>32</sup>	<i>L. implicata, L. obtusa</i>
67	<b>(+)-<math>\alpha</math>-bromocupareno</b>	Sesquiterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. caraibica, L. chondrioides, L. distichophylla, L. flexilis, L. glandulifera, L. okamurae</i>
68	<b><math>\alpha</math>-isobromocupareno</b>	Sesquiterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. glandulifera, L. majuscula, L. microcladia, L. nipponica, L. okamurae, Laurencia sp.</i>
69	<b>cupalaurenol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>27</sup>	indivíduo inteiro <sup>27</sup>	<i>L. venusta, Laurencia sp</i>
70	<b>obtusenol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. obtusa</i>

---

71	<b>dactiol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>33</sup>	indivíduo inteiro <sup>33</sup>	<i>L. poitei</i>
72	<b>pacifigorgiol</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. flexilis, L. luzonensis, L. saitoi, L. snackeyi</i>
73	<b>deacetilparguerol</b>	Diterpeno	<i>A. pulmonica</i> , <sup>34</sup> <i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20,34</sup>	<i>L. saitoi</i>
74	<b>parguerol</b>	Diterpeno	<i>A. dactylomela</i> , <sup>9,11,22</sup> <i>A. Kurodai</i> , <sup>35</sup> <i>A. pulmonica</i> , <sup>34</sup> <i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	glândulas digestivas, <sup>9</sup> indivíduo inteiro <sup>11,20,22,34,35</sup>	<i>L. saitoi</i>
75	<b>parguerol 16-acetato</b>	Diterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>9,11</sup>	glândulas digestivas, <sup>9</sup> indivíduo inteiro <sup>11</sup>	<i>L. saitoi</i>
76	<b>15-bromo-2,7,16-trihidroxyparguer-9(11)-eno</b>	Diterpeno	<i>A. pulmonica</i> <sup>34</sup>	indivíduo inteiro <sup>34</sup>	<i>L. saitoi</i>
77	<b>deoxiparguerol</b>	Diterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>9,11,22</sup>	glândulas digestivas, <sup>9</sup> indivíduo inteiro <sup>11,22</sup>	<i>L. saitoi</i>
78	<b>deoxiparguerol 16-acetato</b>	Diterpeno	<i>A. fasciata</i> <sup>32</sup>	glândulas digestivas e hermafrodita <sup>32</sup>	<i>L. filiformis, L. lageniformis, L. obtusa, L. saitoi</i>
79	<b>deoxiparguerol 7,16-deacetato</b>	Diterpeno	<i>A. kurodai</i> <sup>35</sup>	indivíduo inteiro <sup>35</sup>	<i>L. filiformis</i>

---

					<i>L. saitoi</i>
80	<b>deacetilisoparguerol</b>	Diterpeno	<i>A. pulmonica</i> <sup>34</sup>	indivíduo inteiro <sup>34</sup>	
81	<b>isoparguerol</b>	Diterpeno	<i>A. dactylomela</i> , <sup>9,22</sup> <i>A. kurodai</i> , <sup>35</sup> <i>A. pulmonica</i> <sup>34</sup>	glândulas digestivas, <sup>9</sup> indivíduo inteiro <sup>22,34,35</sup>	<i>L. saitoi</i>
82	<b>aplysina-20</b>	Diterpeno	<i>A. kurodai</i> <sup>36,37</sup>	indivíduo inteiro <sup>36,37</sup>	<i>L. venusta</i>
83	<b>isoconcinndiol</b>	Diterpeno	<i>A. dactylomela</i> , <sup>38</sup> <i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. snyderae var. guadalupensis</i>
84	<b>isoaplisina-20</b>	Diterpeno	<i>A. kurodai</i> <sup>39</sup>	indivíduo inteiro <sup>39</sup>	<i>L. perforata, L. snyderae var. guadalupensis</i>
85	<b>angasiol</b>	Diterpeno	<i>A. angasi</i> <sup>40</sup>	indivíduo inteiro <sup>40</sup>	<i>L. nangii</i>
86	<b>luzodiol</b>	Diterpeno	<i>A. fasciata</i> , <sup>32</sup> <i>A. depilans</i> <sup>41</sup>	glândulas digestivas e hermafrodita, <sup>32</sup> indivíduo inteiro <sup>41</sup>	<i>L. luzonensis</i>
87	<b>dactilomelol</b>	Diterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>5,42</sup>	Animal tissue, <sup>5</sup> glândulas digestivas <sup>42</sup>	<i>Laurencia sp.</i>
88	<b>glandulaurencianol B</b>	Diterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>43</sup>	indivíduo inteiro <sup>43</sup>	<i>L. glandulifera</i>
89	<b>apliadiol</b>	Diterpeno	<i>A. kurodai</i> <sup>44</sup>	indivíduo inteiro <sup>44</sup>	<i>L. caduciramulosa, L. japonensi, L. nangii,</i> <i>Laurencia sp.</i>

---

---

90	<b>tirsiferol</b>	Triterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>45</sup>	manto <sup>45</sup>	<i>L. catarinensis, L. mariannensis, L. saitoi, L. tryrsifera, L. venusta, L. viridis</i>
91	<b>aplisiol A ou (21<math>\alpha</math>-hidroxi-tirsiferol)</b>	Triterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>45</sup>	manto <sup>45</sup>	<i>L. mariannensis</i>
92	<b>venustatriol</b>	Triterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>45</sup>	manto <sup>45</sup>	<i>L. venusta</i>
93	<b>veplisiol B ou (laurenmariannol)</b>	Triterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>45</sup>	manto <sup>45</sup>	<i>L. mariannensis</i>
94	<b>aplisialleno</b>	Acetogenina	<i>A. kurodai</i> <sup>24</sup>	indivíduo inteiro <sup>24</sup>	<i>L. okamurae, Laurencia sp.</i>
95	<b>(12E)-lembine A</b>	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. mariannensis, Laurencia sp.</i>
96	<b>(Z)-maneoneno C</b>	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	glândulas digestivas <sup>8</sup>	<i>L. nidifica</i>
97	<b>lembino A</b>	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>Laurencia sp.</i>
98	<b>dactilino</b>	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>46</sup>	indivíduo inteiro <sup>46</sup>	<i>L. lageniformis, Laurencia sp.</i>
99	<b>(3E)-dactilomelino</b>	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>47</sup>	trato digestivo <sup>47</sup>	<i>L. obtusa</i>
100	<b>laurenino</b>	Acetogenina	<i>A. fasciata</i> <sup>32</sup> , <i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	glândulas digestivas e hermafrodita, <sup>32</sup> indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. chondrioides, L. obtusa</i>
101	<b>(3Z)-laurenino</b>	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>31</sup>	manto <sup>31</sup>	<i>L. nangii, L. yonaguinensis</i>
102	<b>(3Z)-venustineno</b>	Acetogenina	<i>A. fasciata</i> <sup>32</sup>	glândulas digestivas e hermafrodita <sup>32</sup>	<i>L. venusta</i>

---

---

103	<b>(Z)-dihidrorhodofitina</b>	Acetogenina	<i>A. brasiliiana</i> <sup>48</sup>	glândulas digestivas <sup>48</sup>	<i>L. filiformis, L. nangii, L. pinnatifida</i>
104	<b>(3E)-Pinnatifidenino</b>	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>31</sup>	manto <sup>31</sup>	<i>L. chondrioides, L. obtusa, L. pinnatifida</i>
105	<b>Z-pinnatifidenino</b>	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. nangii</i>
106	<b>(3Z)-13-epi-pinnatifidenino</b>	Acetogenina	<i>A. fasciata</i> <sup>32</sup>	glândulas digestivas e hermafrodita <sup>32</sup>	<i>L. claviformis</i>
107	<b>(Z)-isodihidrorhodofitina</b>	Acetogenina	<i>A. brasiliiana</i> <sup>48</sup>	glândulas digestivas <sup>48</sup>	<i>L. obtusa</i>
108	<b>(+)-(3Z)-12-epiobtusenino</b>	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>47</sup>	glândulas digestivas <sup>47</sup>	<i>L. lageniformis</i>
109	<b>(+)-(3Z,6R,7R)-obtusenino</b>	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>31</sup>	manto <sup>31</sup>	<i>L. nangii</i>
110	<b>obtusalleneno IV ou (dactilalleno)</b>	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>49</sup>	parapódios e vísceras <sup>49</sup>	<i>L. marilzae, L. obtusa</i>
111	<b>laurencenino</b>	Acetogenina	<i>A. punctata</i> <sup>20</sup>	indivíduo inteiro <sup>20</sup>	<i>L. okamurae, L. composita</i>
112	<b>(3Z,6R,7R,9Z,12Z)-6-acetoxy-7-cloro-pentadeca-3,9,12-trieno-1-ino</b>	Acetogenina	<i>A. fasciata</i> <sup>32</sup>	glândulas digestivas e hermafrodita <sup>32</sup>	<i>L. pinnatifida</i>
113	<b>(3E)-laurediol</b>	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>11</sup>	indivíduo inteiro <sup>11</sup>	<i>L. nipponica, L. obtusa</i>
114	<b>3,5,6-tribromo-indol</b>	Indol	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. similis, C. papillosus</i>

---

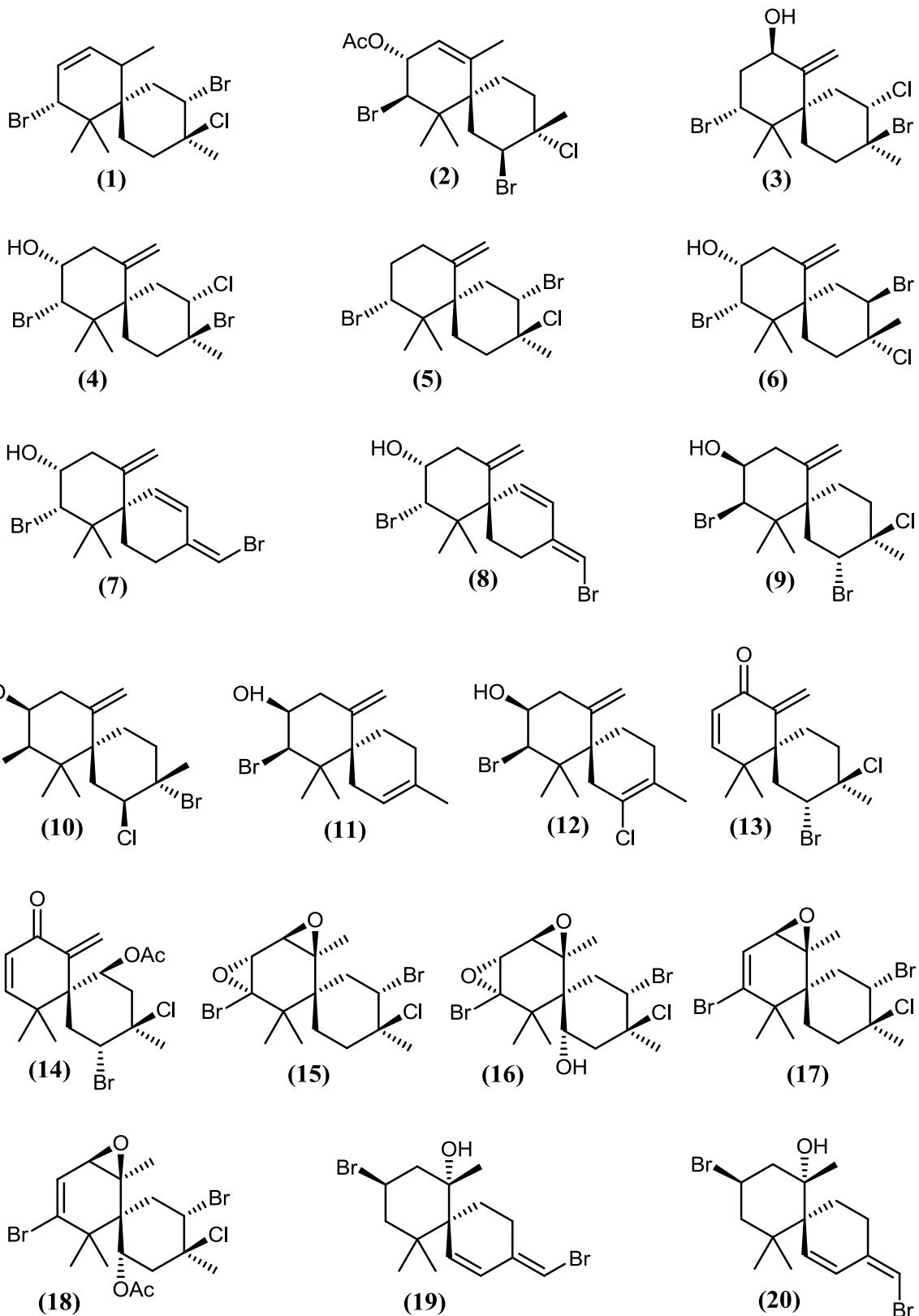
115	<b>2,3,5,6-tetrabromo-indol</b>	Indol	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. bronniartii</i> , <i>L. complanata</i> , <i>L. saitoi</i> , <i>L. similis</i> , <i>C. papillosum</i>
116	<b>N-netyl-2,3,5-tribromo-indol</b>	Indol	<i>A. dactylomela</i> <sup>9,22</sup>	glândulas digestivas, <sup>9</sup> indivíduo inteiro <sup>22</sup>	<i>L. bronniartii</i> , <i>L. complanata</i> , <i>L. decumbens</i> , <i>L. similis</i> , <i>Laurencia</i> sp.
117	<b>N-metil-2,3,5,6-tetrabromo-indol</b>	Indol	<i>A. dactylomela</i> <sup>8</sup>	trato digestivo <sup>8</sup>	<i>L. bronniartii</i> , <i>L. complanata</i> , <i>L. decumbens</i> , <i>L. similis</i> , <i>C. papillosum</i>
118	<b>4-hidroxi-benzaldeido</b>	Aromatico	<i>A. dactylomela</i> <sup>1</sup>	-	<i>L. papillosa</i> , <i>L. tristich</i>

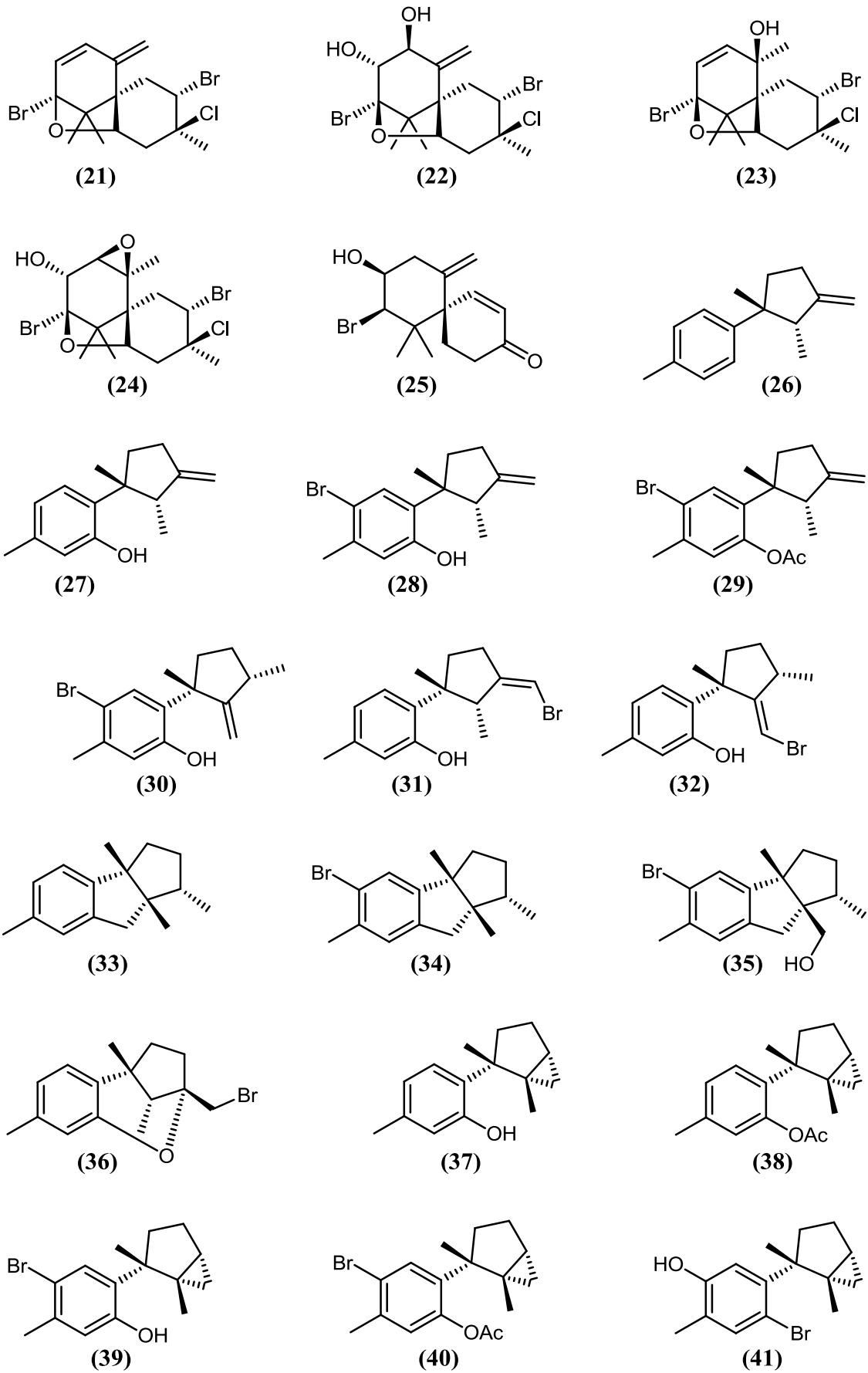
(-) informação não apresentada.

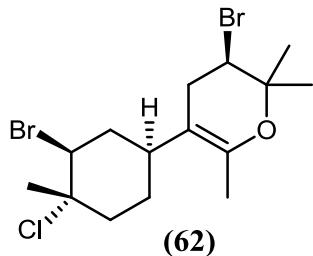
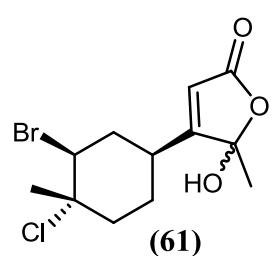
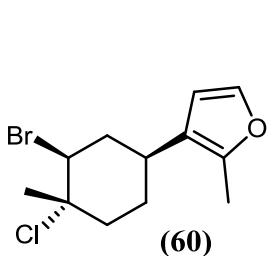
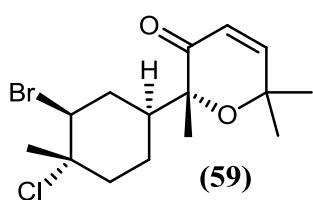
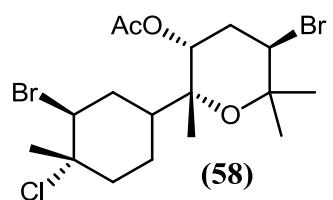
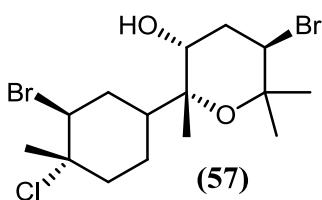
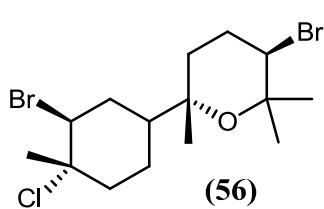
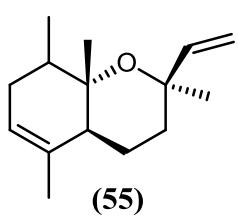
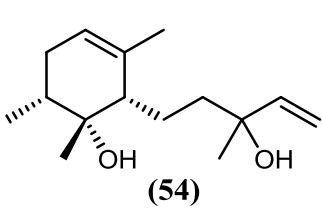
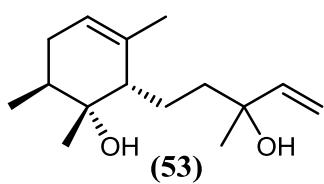
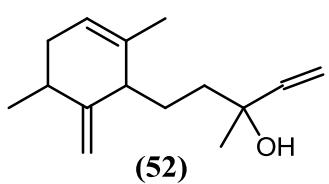
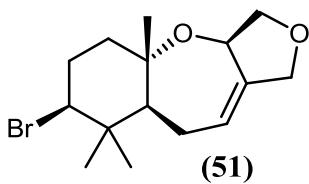
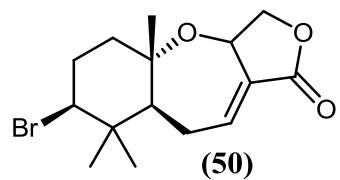
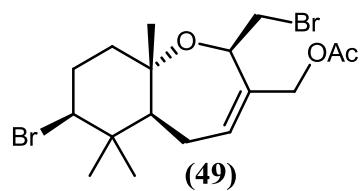
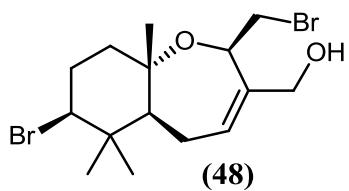
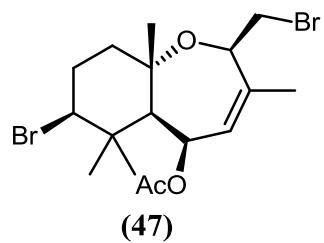
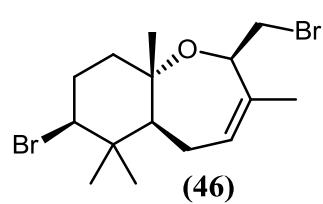
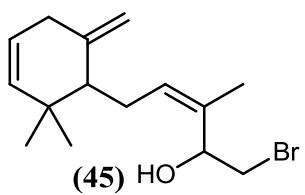
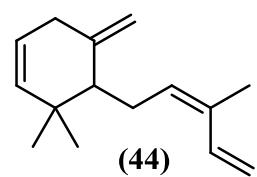
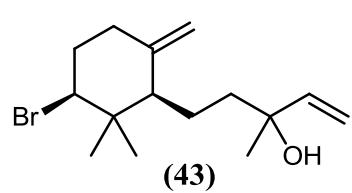
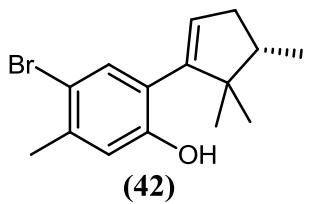
- (1) Harizani, M.; Ioannou, E.; Roussis, V. **2016**. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 102*; Kinghorn, A. D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J. 'ichi, Eds.; Springer International Publishing: Cham, 102: 91–252.
- (2) Hay, M. E. **2009**. *Annual Review of Marine Science*, 1 (1): 193–212.
- (3) Kubanek, J. **2014**. *Journal of Chemical Ecology*, 40 (3): 218–219.
- (4) Kaiser, C. R.; Pitombo, L. F.; Pinto, A. C. **2000**. *Spectroscopy Letters*, 33 (4): 457–467.
- (5) Wessels, M.; König, G. M.; Wright, A. D. **2000**. *Journal of Natural Products*, 63 (7): 920–928.
- (6) Díaz-Marrero, A.-R.; de la Rosa, J. M.; Brito, I.; Darias, J.; Cueto, M. **2012**. *Journal of Natural Products*, 75 (1): 115–118.
- (7) MPhail, K. L.; Davies-Coleman, M. T.; Copley, R. C. B.; Eggleston, D. S. **1999**. *Journal of Natural Products*, 62 (12): 1618–1623.
- (8) Palaniveloo, K.; Vairappan, C. S. **2014**. *Journal of Applied Phycology*, 26 (2): 1199–1205.
- (9) Schmitz, F. J.; Michaud, D. P.; Schmidt, P. G. **1982**. *Journal of the American Chemical Society*, 104 (23): 6415–6423.
- (10) Vairappan, C. S.; Anangdan, S. P.; Matsunaga, S. **2009**. *Malaysian Journal of Science*, 28 (3): 269–273.
- (11) Jiménez-Romero, C.; Mayer, A. M. S.; Rodríguez, A. D. **2014**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*, 24 (1): 344–348.
- (12) Sakai, R.; Higa, T.; Jefford, C. W.; Bernardinelli, G. **1986**. *Helvetica Chimica Acta*, 69 (1): 91–105.

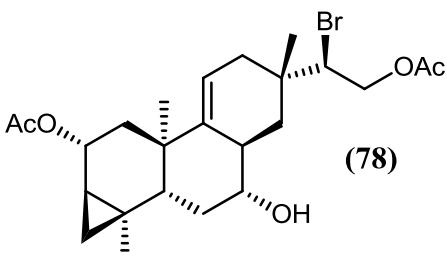
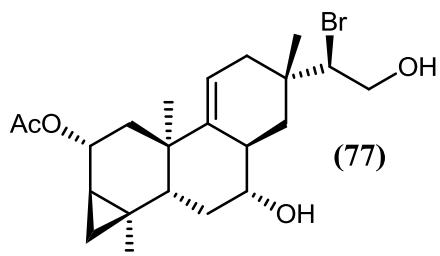
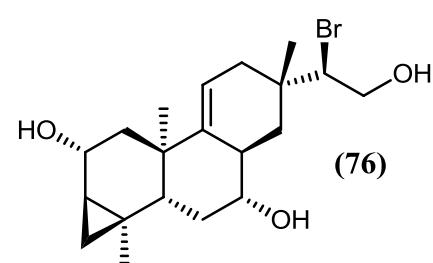
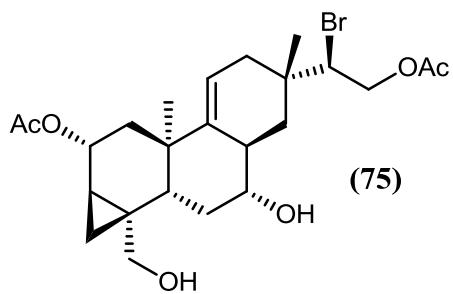
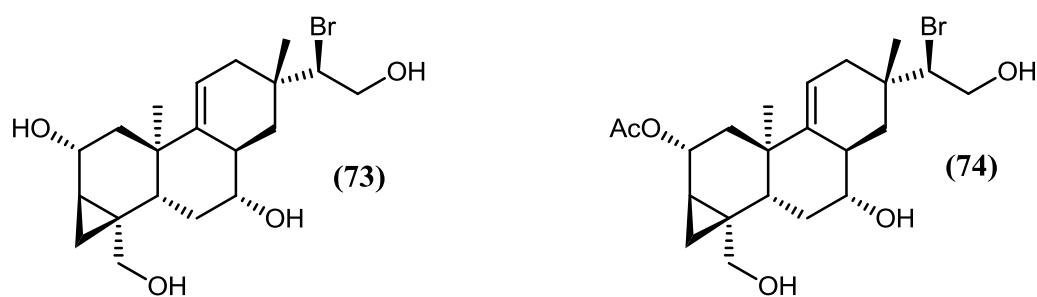
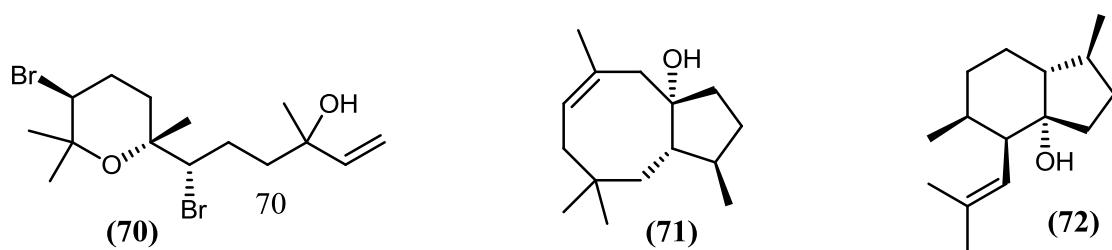
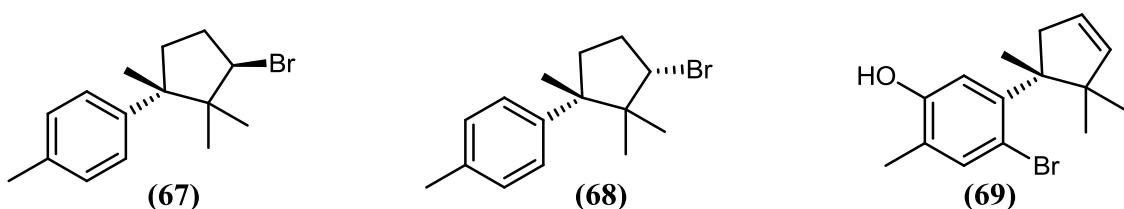
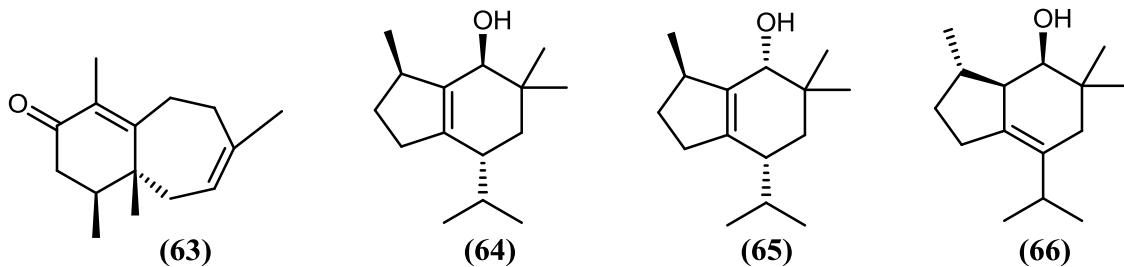
- (13) Kaiser, C. R.; Pitombo, L. F.; Pinto, A. C. **1998**. *Spectroscopy Letters*, 31 (3): 573–585.
- (14) John Faulkner, D.; Stallard, M. O.; Ireland, C. **1974**. *Tetrahedron Letters*, 15 (40): 3571–3574.
- (15) Ireland, C.; Stallard, M. O.; Faulkner, D. J.; Finer, J.; Clardy, J. **1976**. *The Journal of Organic Chemistry*, 41 (14): 2461–2465.
- (16) González, A. G.; Martín, J. D.; Norte, M.; Pérez, R.; Weyler, V.; Perales, A.; Fayos, J. **1983**. *Tetrahedron Letters*, 24 (8): 847–848.
- (17) Stallard, M. O.; Faulkner, D. J. **1974**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 49 (1): 37–41.
- (18) Stallard, M. O.; Faulkner, D. J. **1974**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 49 (1): 25–35.
- (19) Kaiser, C. R.; Pitombo, L. F.; Pinto, A. C. **2001**. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 39 (3): 147–149.
- (20) Findlay, J. A.; Li, G. **2002**. *Canadian Journal of Chemistry*, 80 (12): 1697–1707.
- (21) Appleton, D. R.; Babcock, R. C.; Copp, B. R. **2001**. *Tetrahedron*, 57 (51): 10181–10189.
- (22) Schmitz, F. J.; Gopichand, Y.; Michaud, D. P.; Prasad, R. S.; Remaley, S.; Hossain, M. B.; Rahman, A.; Sengupta, P. K.; van der Helm, D. **1981**. *Pure and Applied Chemistry*, 53 (4): 853–865.
- (23) Yamamura, S.; Hirata, Y. **1963**. *Tetrahedron*, 19 (10): 1485–1496.
- (24) Okamoto, Y.; Nitanda, N.; Ojika, M.; Sakagami, Y. **2001**. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 65 (2): 474–476.
- (25) Miyamoto, T.; Ebisawa, Y.; Higuchi, R. **1995**. *Tetrahedron Letters*, 36 (34): 6073–6074.
- (26) Tsukamoto, S.; Yamashita, Y.; Ohta, T. **2005**. *Marine Drugs*, 3 (2): 22–28.
- (27) Ichiba, T.; Higa, T. **1986**. *The Journal of Organic Chemistry*, 51 (17): 3364–3366.

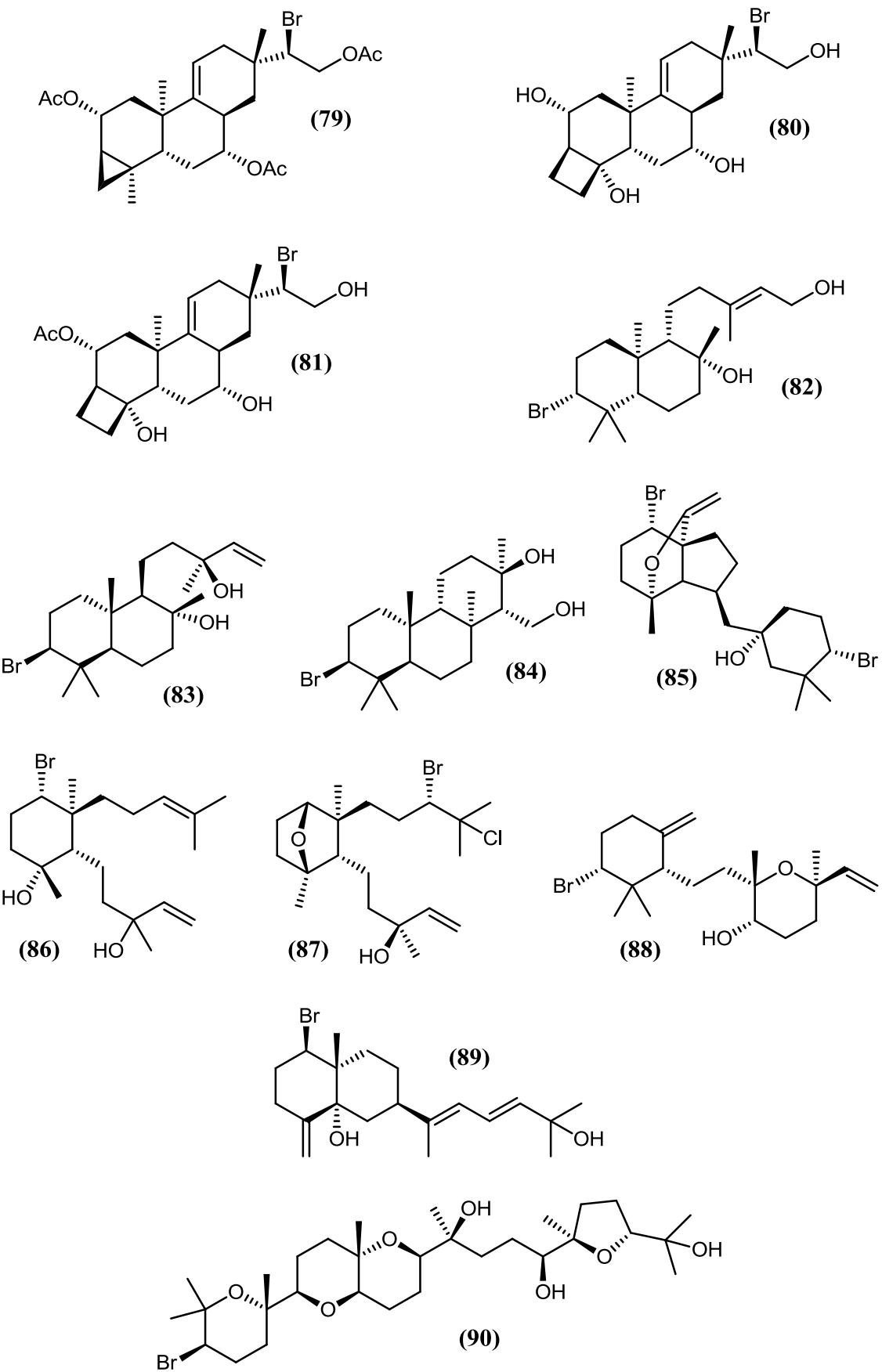
- (28) Schmitz, F. J.; McDonald, F. J.; Vanderah, D. J. **1978**. *The Journal of Organic Chemistry*, 43 (21): 4220–4225.
- (29) Brito, I.; Dias, T.; Díaz-Marrero, A. R.; Darias, J.; Cueto, M. **2006**. *Tetrahedron*, 62 (41), 9655–9660.
- (30) Stallard, M. O.; Fenical, W.; Kittredge, J. S. **1978**. *Tetrahedron*, 34 (14): 2077–2081.
- (31) Manzo, E.; Ciavatta, M. L.; Gavagnin, M.; Puliti, R.; Mollo, E.; Guo, Y.-W.; Mattia, C. A.; Mazzarella, L.; Cimino, G. **2005**. *Tetrahedron*, 61 (31): 7456–7460.
- (32) Ioannou, E.; Nappo, M.; Avila, C.; Vagias, C.; Roussis, V. **2009**. *Journal of Natural Products*, 72 (9): 1716–1719.
- (33) Schmitz, F. J.; Hollenbrek, K. H.; Vanderah, D. J. **1978**. *Tetrahedron*, 34 (18): 2719–2722.
- (34) Bian, W. T.; You, Z. J.; Wang, C. Y.; Shao, C.L. **2014**. *Chemistry of Natural Compounds*, 50 (3): 557–559.
- (35) Tsukamoto, S.; Yamashita, Y.; Yoshida, T.; Ohta, T. **2004**. *Marine Drugs*, 2 (4): 170–175.
- (36) Yamamura, S.; Hirata, Y. **1971**. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 44 (9): 2560–2562.
- (37) Matsuda, H.; Tomiie, Y.; Yamamura, S.; Hirata, Y. **1967**. *Chemical Communications (London)*, 17: 898b–899.
- (38) Rodríguez, M. L.; Martín, J. D.; Estrada, D. **1989**. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, 45 (2): 306–308.
- (39) Yamamura, S.; Terada, Y. **1977**. *Tetrahedron Letters*, 18 (25): 2171–2172.
- (40) Pettit, G. R.; Herald, C. L.; Einck, J. J.; Vanell, L. D.; Brown, P.; Gust, D. **1978**. *The Journal of Organic Chemistry*, 43 (24): 4685–4686.
- (41) Petraki, A.; Ioannou, E.; Papazafiri, P.; Roussis, V. **2015**. *Journal of Natural Products*, 78 (3): 462–467.
- (42) Estrada, D. M.; Ravelo, J. L.; Ruiz-Pérez, C.; Martín, J. D.; Solans, X. **1989**. *Tetrahedron Letters*, 30 (45): 6219–6220.
- (43) Kladi, M.; Ntountaniotis, D.; Zervou, M.; Vagias, C.; Ioannou, E.; Roussis, V. **2014**. *Tetrahedron Letters*, 55 (17): 2835–2837.
- (44) Ojika, M.; Yoshida, Y.; Okumura, M.; Ieda, S.; Yamada, K. **1990**. *Journal of Natural Products*, 53, 1619–1622.
- (45) Manzo, E.; Gavagnin, M.; Bifulco, G.; Cimino, P.; Di Micco, S.; Ciavatta, M. L.; Guo, Y. W.; Cimino, G. **2007**. *Tetrahedron*, 63 (40): 9970–9978.
- (46) McDonald, F. J.; Campbell, D. C.; Vanderah, D. J.; Schmitz, F. J.; Washecheck, D. M.; Burks, J. E.; Van der Helm, D. **1975**. *The Journal of Organic Chemistry*, 40 (5): 665–666.
- (47) Gopichand, Y.; Schmitz, F. J.; Shelley, J.; Rahman, A.; Van der Helm, D. **1981**. *The Journal of Organic Chemistry*, 46 (25): 5192–5197.
- (48) Kinnel, R. B.; Dieter, R. K.; Meinwald, J.; Van Engen, D.; Clardy, J.; Eisner, T.; Stallard, M. O.; Fenical, W. **1979**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76 (8): 3576–3579.
- (49) Letizia Ciavatta, M.; Gavagnin, M.; Puliti, R.; Cimino, G.; Martínez, E.; Ortea, J.; Andrea Mattia, C. **1997**. *Tetrahedron*, 53 (51), 17343–17350.
- (50) Jongaramruong, J.; Blackman, A. J.; Skelton, B. W.; White, A. H. **2002**. *Australian journal of chemistry*, 55(4), 275–280.

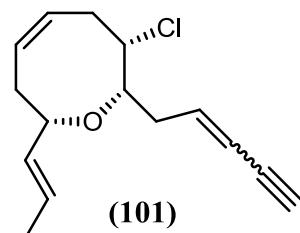
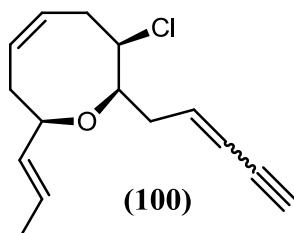
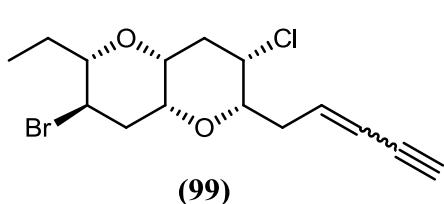
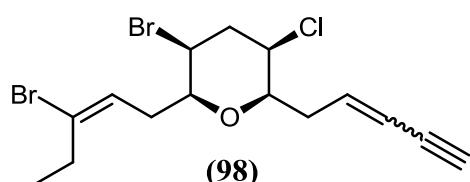
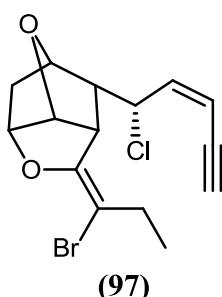
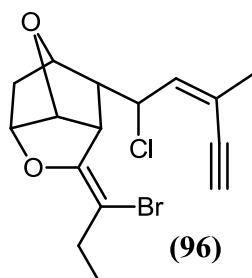
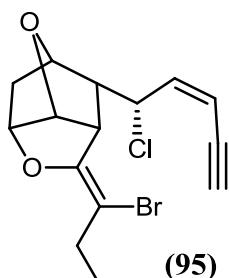
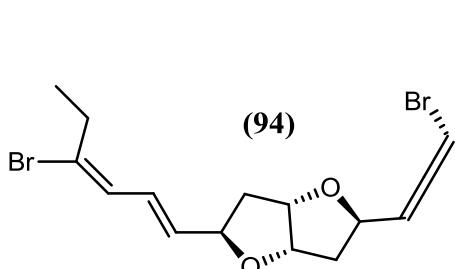
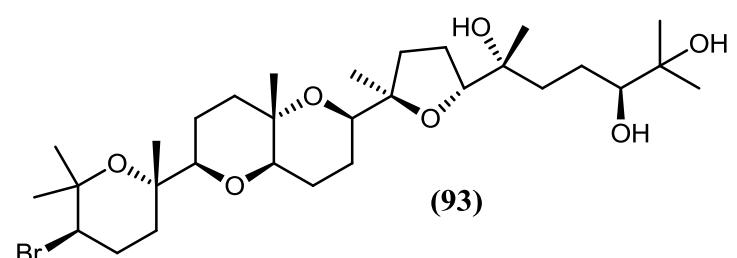
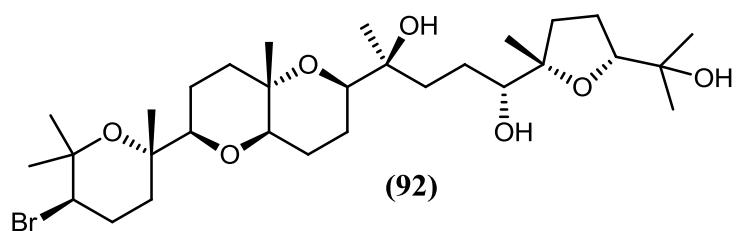
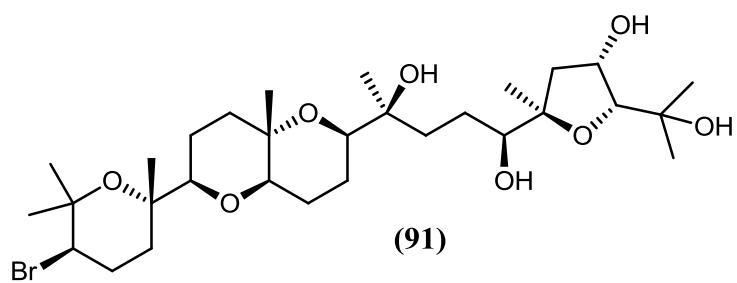


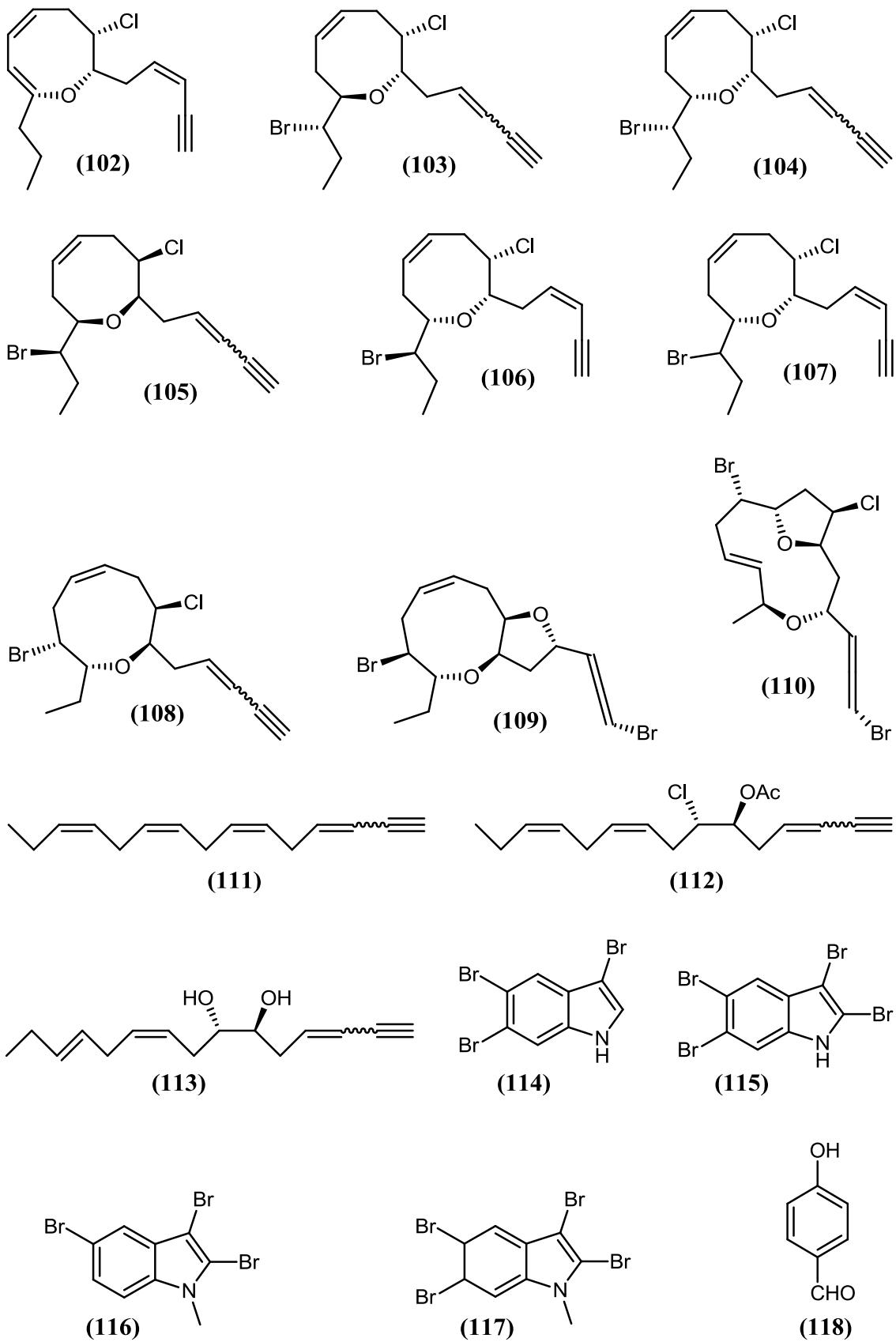












**ANEXO 2.** Tabela e estruturas dos metabólitos isoladas em espécies de *Aplysia* derivados de substâncias de espécies de *Laurencia*. A classe química, a origem histológica em *Aplysia*, o metabólito de *Laurencia* precursor e a espécie de *Laurencia* que deu origem ao precursor são apresentados.

DERIVADO	CLASSE	ESPÉCIE DE <i>Aplysia</i>	ORIGEM HISTOLOGICA EM <i>Aplysia</i>	METABÓLITO PRECURSOR ( <i>Laurencia</i> )	ORIGEM DO METABÓLITO PRECURSOR ( <i>Laurencia</i> )
<b>acetato de allolaurinterol</b> (29)	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>1</sup>	glândulas digestivas <sup>1</sup>	allolaurinterol (175)	<i>L. filiformis f. heteroclada</i> <sup>2</sup>
<b>acetato de isoobtusol</b> (119)	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>1,3</sup>	Animal tissue, <sup>3</sup> glândulas digestivas <sup>1</sup>	isoobtusol (10)	Anexo Tabela 1
<b>epiobtusano</b> (120)	Sesquiterpeno	<i>A. oculifera</i> <sup>4</sup>	glândulas digestivas <sup>4</sup>	obtusano (176)	<i>L. compósita, L. decumbens, L. dendroidea, L. majuscula, L. mariannensis, L. obtusa, L. okamurae, L. scoparia</i> <sup>2</sup>
<b>acetildesclorelatol</b> (121)	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>5</sup>	glândulas digestivas <sup>5</sup>	desclorelatol (11)	Anexo Tabela 1
<b>acetilelatol</b> (122)	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>5</sup>	glândulas digestivas <sup>5</sup>	elatol (12)	Anexo Tabela 1
<b>(5aR, 7R, 8S, 9aS) -2,7-dibromo-</b>	Sesquiterpeno	<i>A. californica</i> <sup>6</sup>	glândulas digestivas <sup>6</sup>	pacifidieno (21)	Anexo Tabela 1

**3,8-dicloro-5,8,10,10-tetrametil-  
2,3,7,8,9,9a-hexahidro-6H-2,5a-  
metanobenzo [b] oxepina (123)**

<b>acetato de isolaurenisol (124)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>7</sup>	indivíduo inteiro <sup>7</sup>	isolaurenisol ( <b>32</b> )	Anexo Tabela 1
<b>ibhayinol (125)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>8,9</sup>	glândulas digestivas, <sup>8</sup> indivíduo inteiro <sup>9</sup>	isoaplisina ( <b>177</b> )	<i>L. okamurae</i> <sup>2</sup>
<b>ciclolaureno (126)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>10</sup>	indivíduo inteiro <sup>10</sup>	Laurentol	Anexo Tabela 1
<b>acetato de ciclolaurenol (127)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>10</sup>	indivíduo inteiro <sup>10</sup>	laurentol	Anexo Tabela 1
<b>6-<i>epi</i>-β-snyderol (128)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. fasciata</i> <sup>11</sup>	glândulas digestivas e hermafrodita <sup>11</sup>	β-snyderol ( <b>43</b> )	Anexo Tabela 1
<b>acetato de dactilenol (129)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>12</sup>	-	dactilenol ( <b>52</b> )	Ver Tabela II.1
<b>dactiloxeno B (130)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>12,13</sup>	indivíduo inteiro <sup>13</sup>	dactilenol ( <b>52</b> )	Anexo Tabela 1
<b>dactiloxeno C (131)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>12</sup>	-	dactilenol ( <b>52</b> )	Anexo Tabela 1
<b>acetato de puertitol B (132)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>3</sup>	tecido do animal (não especificado) <sup>3</sup>	puertitol A e B ( <b>178 e 179</b> )	<i>L. obtusa</i> <sup>2</sup>
<b>desclorobromocaespitol (133)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>14</sup>	glândulas digestivas <sup>14</sup>	caespitol ( <b>57</b> )	Anexo Tabela 1
<b>desclorobromocaespitenona (134)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. Sesquiterpeno dactylomela</i> <sup>14</sup>	manto <sup>14</sup>	caespitol ( <b>57</b> )	Anexo Tabela 1
<b>deodactol (135)</b>	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>15</sup>	glândulas digestivas <sup>15</sup>	caespitol ( <b>57</b> ) e	Anexo Tabela 1

---

				isocaespitol ( <b>57</b> )	
<b>Isodeodactol</b> (136)	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>16</sup>	glândulas digestivas <sup>16</sup>	caespitol ( <b>57</b> )	Anexo Tabela 1
<b>dihidroxi-deodactol monoacetato</b> (137)	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>17</sup>	glândulas digestivas <sup>17</sup>	caespitol ( <b>57</b> )	Anexo Tabela 1
<b>aplysiadactidiol</b> (138)	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>14</sup>	glândulas digestivas <sup>14</sup>	puertitol A e B ( <b>178</b> e <b>179</b> )	<i>L. obtusa</i> <sup>2</sup>
<b>perforatol</b> (139)	Sesquiterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>18</sup>	indivíduo inteiro <sup>18</sup>	perforatona ( <b>180</b> )	<i>L. obtusa, L. perforata</i> <sup>2</sup>
<b>acetato de brasilenol</b> (140)	Sesquiterpeno	<i>A. brasiliiana</i> , <sup>19</sup> <i>A. fasciata</i> <sup>11</sup>	glândulas digestivas, <sup>19</sup> glândulas digestivas e hermafrodita <sup>11</sup>	brasilenol ( <b>64</b> )	Anexo Tabela 1
<b>acetato de epibrasilenol</b> (141)	Sesquiterpeno	<i>A. fasciata</i> <sup>11</sup>	glândulas digestivas e hermafrodita <sup>11</sup>	epibrasilenol ( <b>66</b> )	Anexo Tabela 1
<b>acetato de cupalaurenol</b> (142)	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>10</sup>	indivíduo inteiro <sup>10</sup>	cupalaurenol ( <b>69</b> )	Anexo Tabela 1
<b>brasudol</b> (143)	Sesquiterpeno	<i>A. brasiliiana</i> <sup>20</sup>	glândulas digestivas <sup>20</sup>	β-eudesmol ( <b>181</b> )	<i>L. obtusa</i> <sup>21</sup>
<b>isobrasudol</b> (144)	Sesquiterpeno	<i>A. brasiliiana</i> <sup>20</sup>	glândulas digestivas <sup>20</sup>	β-eudesmol	<i>L. obtusa</i> <sup>21</sup>

---

<b>iankalapuol A</b> (145)	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>22</sup>	indivíduo inteiro <sup>22</sup>	heterocladol ( <b>182</b> )	<i>L. filifarmis</i> <sup>23</sup>
<b>lankalapuol B</b> (146)	Sesquiterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>22</sup>	indivíduo inteiro <sup>22</sup>	heterocladol ( <b>182</b> )	<i>L. filifarmis</i> <sup>23</sup>
<b>16-acetato de isoparguerol</b> (147)	Diterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>1,24</sup>	glândulas digestivas, <sup>1</sup> indivíduo inteiro <sup>24</sup>	isoparguerol 7,16- diacetato ( <b>183</b> )	<i>L. saitoi</i> <sup>2</sup>
<b>neopargueroldiona</b> (148)	Diterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>18</sup>	indivíduo inteiro <sup>18</sup>	isoparguerol ( <b>184</b> )	Anexo Tabela 1
<b>acatato de angasiol</b> (149)	Diterpeno	<i>A. juliana</i> <sup>25</sup>	indivíduo inteiro <sup>25</sup>	irieol A ( <b>185</b> ), pinnaterpeno C ( <b>186</b> ), angasiol ( <b>187</b> )	<i>Laurencia cf. irieii</i> , <i>L. decumbens</i> , <i>L. mariannensis</i> , <i>L. pinnata</i> , <i>L. nangii</i> <sup>2</sup>
<b>5-((1R, 2S, 3S)-3-bromo-2- (3-bromo-4-hidroxi-4-metilpentil)-2- metil-6-metileneciclo-hexil)-3- metilpent-1-en-3-ol</b> (150 e 151)	Diterpeno	<i>A. depilans</i> <sup>26</sup>	indivíduo inteiro <sup>26</sup>	luzodiol ( <b>188</b> ) e laurendecumtriol ( <b>189</b> )	<i>L. luzonensis</i> , <i>L. decumbens</i> <sup>2</sup>
<b>5-((1S, 2R, 6S)-6-bromo-2- (3-hidroxi-3-metilpent-4-en-1-il)- 1,3-dimetilciclo-hexil) -2- metilpent-2,3-diol</b> (152)	Diterpeno	<i>A. depilans</i> <sup>26</sup>	indivíduo inteiro <sup>26</sup>	luzodiol ( <b>188</b> ) e laurendecumtriol ( <b>189</b> )	<i>L. luzonensis</i> , <i>L. decumbens</i> <sup>2</sup>
<b>5-((1R, 2S, 3S)-3-bromo-2-(4-hidroxi-3-metoxi-4-metilpentil)-2-metil-6-metileneciclo-hexil)-3-</b>	Diterpeno	<i>A. depilans</i> <sup>26</sup>	indivíduo inteiro <sup>26</sup>	luzodiol ( <b>188</b> ) e laurendecumtriol ( <b>189</b> )	<i>L. luzonensis</i> , <i>L. decumbens</i> <sup>2</sup>

<b>metilpent-1-en-3-ol</b> (153)					
<b>5-((1R, 2S, 3S)-3-bromo-2-(2-(3,3-dimetiloxiran-2-il) etil)-2-metil-6-metileneciclo-hexil)-3-metilpent-1-en-3-ol</b> (154)	Diterpeno	<i>A. depilans</i> <sup>26</sup>	indivíduo inteiro <sup>26</sup>	luzodiol ( <b>188</b> ) e laurendecumtriol ( <b>189</b> )	<i>L. luzonensis</i> , <i>L. decumbens</i> <sup>2</sup>
<b>1-((1S, 2R, 6S)-6-bromo-2-(3-hidroxi-3-metilpent-4-en-1-il)-1-metil-3-metileneciclo-hexil)-4-metilpentan-3- 1</b> (155)	Diterpeno	<i>A. depilans</i> <sup>26</sup>	indivíduo inteiro <sup>26</sup>	luzodiol ( <b>188</b> ) e laurendecumtriol ( <b>189</b> )	<i>L. luzonensis</i> , <i>L. decumbens</i> <sup>2</sup>
<b>5-((1S, 2R, 6S)-6-bromo-2-(3-hidroxi-3-metilpent-4-en-1-il)-1-metil-3-metileneciclo-hexil)-2-metilpent-1- en-3-ol</b> (156)	Diterpeno	<i>A. depilans</i> <sup>26</sup>	indivíduo inteiro <sup>26</sup>	luzodiol ( <b>188</b> ) e laurendecumtriol ( <b>189</b> )	<i>L. luzonensis</i> , <i>L. decumbens</i> <sup>2</sup>
<b>acetato de punctatena</b> (157)	Diterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>18</sup>	indivíduo inteiro <sup>18</sup>	dactilomelol	Anexo Tabela 1
<b>14-bromo-obtus-1-eno-3,11-diol</b> (158)	Diterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>27</sup>	glândulas digestivas <sup>27</sup>	obtusadiol ( <b>190</b> )	<i>L. microcladia</i> , <i>L. obtusa</i> <sup>2</sup>
<b>punctatol</b> (159)	Diterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>18</sup>	indivíduo inteiro <sup>18</sup>	dactilomelol ( <b>87</b> )	Anexo Tabela 1
<b>glandulaurencianol C</b> (160)	Diterpeno	<i>A. punctata</i> <sup>28</sup>	indivíduo inteiro <sup>28</sup>	glandulaurencianol A ( <b>191</b> ) e B ( <b>192</b> )	<i>L. glandulifera</i> <sup>2</sup>
<b>dactilopiranoide</b> (161)	Diterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>3</sup>	Animal tissue <sup>3</sup>	laurencianol ( <b>193</b> )	<i>L. obtusa</i> <sup>2</sup>
<b>acetato de dactiloditerpenol</b> (162)	Diterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>29</sup>	indivíduo inteiro <sup>29</sup>	laurenditerpenol ( <b>194</b> )	<i>L. intricata</i> <sup>2</sup>
<b>apliadiol metil éster</b> (163)	Diterpeno	<i>A. kurodai</i> <sup>30</sup>	indivíduo inteiro <sup>30</sup>	apliadiol ( <b>89</b> )	Anexo Tabela 1

<b>aplisqualenol A</b> (164)	Triterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>31</sup>	indivíduo inteiro <sup>31</sup>	tirsiferol ( <b>90</b> ) e venustatriol ( <b>92</b> )	Anexo Tabela 1
<b>aplisqualenol B</b> (165)	Triterpeno	<i>A. dactylomela</i> <sup>31</sup>	indivíduo inteiro <sup>31</sup>	tirsiferol ( <b>90</b> ) e enustatriol ( <b>92</b> )	Anexo Tabela 1
<b>panaceno</b> (166)	Acetogenina	<i>A. brasiliiana</i> <sup>32</sup>	glândulas digestivas <sup>32</sup>	precursor de sesquiterpeno de alga	
<b>isodactylyna</b> (167)	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>33</sup>	indivíduo inteiro <sup>33</sup>	dactilyne ( <b>98</b> )	Anexo Tabela 1
<b>srilankenina</b> (168)	Acetogenina	<i>A. oculifera</i> <sup>34</sup>	indivíduo inteiro <sup>34</sup>	derivado de dialquil tetrahidropirano	
<b>(3Z)-dactilomelina</b> (169)	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>16</sup>	glândulas digestivas <sup>16</sup>	dactilina ( <b>98</b> ) e isodactilina ( <b>ent-98</b> )	Anexo Tabela 1
<b>(3E,6R,7R)-pinnatifidenina</b> (170)	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>35</sup>	manto <sup>35</sup>	(+)-(3E)-13- <i>epi</i> -pinnatifidenina ( <b>195</b> )	<i>L. obtusa</i> <sup>36</sup>
<b>(3Z)-bromoficina</b> (171)	Acetogenina	<i>A. parvula</i> <sup>37</sup>	indivíduo inteiro <sup>37</sup>	bromoficina ( <b>196</b> )	<i>L. implicata</i> , <i>L. pannosa</i> <sup>2</sup>
<b>brasilenina</b> (172)	Acetogenina	<i>A. brasiliiana</i> <sup>38</sup>	glândulas digestivas <sup>38</sup>	rodoftina ( <b>197</b> )	<i>Laurencia</i> spp. <sup>39</sup>
<b>(+)-(3E)-12-epiobtusenina</b> (173)	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>16</sup>	glândulas digestivas <sup>16</sup>	dactylyna ( <b>98</b> ) e isodactylyna ( <b>ent-98</b> )	Anexo Tabela 1
<b>(+)-(3E,6R,7R)-obtusenina</b> (174)	Acetogenina	<i>A. dactylomela</i> <sup>35</sup>	manto <sup>35</sup>	obtusenina ( <b>108</b> )	Ver Tabela II.1

(-) informação não apresentada.

- (1) Schmitz, F. J.; Michaud, D. P.; Schmidt, P. G. **1982**. *Journal of the American Chemical Society*, 104 (23): 6415–6423.
- (2) Harizani, M.; Ioannou, E.; Roussis, V. **2016**. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 102*; Kinghorn, A. D., Falk, H., Gibbons, S., Kobayashi, J. 'ichi, Eds.; Springer International Publishing: Cham, 102: 91–252.
- (3) Wessels, M.; König, G. M.; Wright, A. D. **2000**. *Journal of Natural Products*, 63 (7): 920–928.
- (4) Hegazy, M.-E. F.; Moustafa, A. Y.; Mohamed, A. E.-H. H.; Alhammady, M. A.; Elbehairi, S. E. I.; Ohta, S.; Paré, P. W. **2014**. *Tetrahedron Letter*, 55 (10): 1711–1714.
- (5) Dias, T.; Brito, I.; Moujir, L.; Paiz, N.; Darias, J.; Cueto, M. **2005**. *Journal of Natural Products*, 68 (11): 1677–1679.
- (6) Stallard, M. O.; Faulkner, D. J. **1974**. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 49 (1): 37–41.
- (7) Appleton, D. R.; Babcock, R. C.; Copp, B. R. **2001**. *Tetrahedron*, 57 (51): 10181–10189.
- (8) McPhail, K. L.; Davies-Coleman, M. T.; Copley, R. C. B.; Eggleston, D. S. **1999**. *Journal of Natural Products*, 62 (12): 1618–1623.
- (9) Copley, R. C. B.; Davies-Coleman, M. T.; Edmonds, D. R.; Faulkner, D. J.; McPhail, K. L. **2002**. *Journal of Natural Products*, 65 (4): 580–582.
- (10) Ichiba, T.; Higa, T. **1986**. *The Journal of Organic Chemistry*, 51 (17): 3364–3366.
- (11) Ioannou, E.; Nappo, M.; Avila, C.; Vagias, C.; Roussis, V. **2009**. *Journal of Natural Product*, 72 (9): 1716–1719.
- (12) Schmitz, F. J.; McDonald, F. J.; Vanderah, D. J. **1978**. *The Journal of Organic Chemistry*, 43 (21): 4220–4225.
- (13) Schmitz, F. J.; McDonald, F. J. **1974**. *Tetrahedron Letters*, 15 (29): 2541–2544.
- (14) Brito, I.; Dias, T.; Díaz-Marrero, A. R.; Darias, J.; Cueto, M. **2006**. *Tetrahedron*, 62 (41): 9655–9660.
- (15) Hollenbeak, K. H.; Schmitz, F. J.; Hossain, M. B.; van Der Helm, D. **Tetrahedron** **1979**, 35 (4), 541–545.
- (16) Gopichand, Y.; Schmitz, F. J.; Shelley, J.; Rahman, A.; Van der Helm, D. **1981**. *The Journal of Organic Chemistry*, 46 (25): 5192–5197.
- (17) Schmitz, F. J.; Michaud, D. P.; Hollenbeak, K. H. **1980**. *The Journal of Organic Chemistry*, 45 (8): 1525–1528.
- (18) Findlay, J. A.; Li, G. **2002**. *Canadian Journal of Chemistry*, 80 (12): 1697–1707.
- (19) Stallard, M. O.; Fenical, W.; Kittredge, J. S. **1978**. *Tetrahedron*, 34 (14): 2077–2081.
- (20) Dieter, R. K.; Kinnel, R.; Meinwald, J.; Eisner, T. **1979**. *Tetrahedron Letters*, 20 (19): 1645–1648.
- (21) Demirel, Z.; Yilmaz-Koz, F. F.; Karabay-Yavasoglu, N. U.; Ozdemir, G.; Sukatar, A. **2011**. *Romanian biotechnological letters*, 16 (1): 5927–5936.
- (22) Baker, B.; Ratnapala, L.; Mahindaratne, M. P. ; de Silva, E. D.; Tillekeratne, L. M. ; Jeong, J. H.; Scheuer, P. J.; Seff, K. **1988**. *Tetrahedron*, 44 (15): 4695–4701.
- (23) Kazlauskas, R.; Murphy, P. T.; Wells, R. J.; Daly, J. J.; Oberhansli, W. E. **1977**. *Australian Journal of Chemistry*, 30 (12): 2679–2687.
- (24) Schmitz, F. J.; Gopichand, Y.; Michaud, D. P.; Prasad, R. S.; Remaley, S.; Hossain, M. B.; Rahman, A.; Sengupta, P. K.; van der Helm, D. **1981**. *Pure and Applied Chemistry*, 53 (4): 853–865.
- (25) Atta-ur-Rahman, null; Alvi, K. A.; Abbas, S. A.; Sultana, T.; Shameel, M.; Choudhary, M. I.; Clardy, J. C. **1991**. *Journal of Natural Products*, 54 (3): 886–888.
- (26) Petraki, A.; Ioannou, E.; Papazafiri, P.; Roussis, V. **2015**. *Journal of Natural Product*, 78 (3): 462–467.
- (27) Schmitz, F. J.; Hollenbeak, K. H.; Carter, D. C.; Hossain, M. B.; Van der Helm, D. **1979**. *The Journal of Organic Chemistry*, 44 (14): 2445–2447.
- (28) Kladi, M.; Ntountaniotis, D.; Zervou, M.; Vagias, C.; Ioannou, E.; Roussis, V. **2014**. *Tetrahedron Letters*, 55 (17): 2835–2837.
- (29) Jiménez-Romero, C.; Mayer, A. M. S.; Rodríguez, A. D. **2014**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 24 (1): 344–348.
- (30) Ojika, M.; Yoshida, Y.; Okumura, M.; Ieda, S.; Yamada, K. **1990**. *Journal of Natural Product*, 53: 1619–1622.
- (31) Vera, B.; Rodríguez, A. D.; Avilés, E.; Ishikawa, Y. **2009**. *European Journal of Organic Chemistry*, 2009 (31): 5327–5336.
- (32) Kinnel, R.; Duggan, A. J.; Eisner, T.; Meinwald, J.; Miura, I. **1977**. *Tetrahedron Letters*, 18 (44): 3913–3916.
- (33) Vanderah, D. J.; Schmitz, F. J. **1976**. *Notes*, 41 (21): 3481.
- (34) Dilip de Silva, E.; Schwartz, R. E.; Scheuer, P. J.; Shoolery, J. N. **1983**. *The Journal of Organic Chemistry*, 48 (3): 395–396.
- (35) Manzo, E.; Gavagnin, M.; Bifulco, G.; Cimino, P.; Di Micco, S.; Ciavatta, M. L.; Guo, Y. W.; Cimino, G. **2007**. *Tetrahedron*, 63 (40): 9970–9978.
- (36) Iliopoulos, D.; Vagias, C.; Harvala, C.; Roussis, V. **2002**. *Phytochemistry*, 59(1):111–116.
- (37) McPhail, K. L.; Davies-Coleman, M. T. *Natural Product Research* **2005**, 19 (5), 449–452.
- (38) Kinnel, R. B.; Dieter, R. K.; Meinwald, J.; Van Engen, D.; Clardy, J.; Eisner, T.; Stallard, M. O.; Fenical, W. **1979**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76 (8): 3576–3579.
- (39) Fenical, W. **1974**. *Journal of the American Chemical Society*, 96 (17): 5580–5581.

