



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE NEOTROPICAL
MESTRADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JULIANA MAGALHÃES DE ARAUJO

Variação interpopulacional de produtos naturais e sequências moleculares
na alga parva *Canistrocarpus cervicornis*.

Rio de Janeiro

2014

Variação interpopulacional de produtos naturais e sequências moleculares
na alga parda *Canistrocarpus cervicornis*.

Juliana Magalhães de Araujo

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biodiversidade Neotropical do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas

Orientadores: Dr. Joel Campos De Paula

Dr. Fabiano Salgueiro

Rio de Janeiro

2014

Variação interpopulacional de produtos naturais e sequências moleculares
na alga parva *Canistrocarpus cervicornis*.

Juliana Magalhães de Araujo

Orientadores: Dr. Joel Campos De Paula

Dr. Fabiano Salgueiro

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biodiversidade Neotropical do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Dissertação avaliada em 06 de outubro de 2014, pela banca examinadora:

Dra. Beatriz Grosso Fleury
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Dra. Diana Negrão Cavalcanti
Universidade Federal Fluminense

Dra. Maria Beatriz Barbosa de Barros Barreto
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dr. Fabiano Salgueiro
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Dr. Joel Campos de Paula
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

A663 Araujo, Juliana Magalhães de.
Variação interpopulacional de produtos naturais e sequências moleculares na alga parda *Canistrocarpus cervicornis* / Juliana Magalhães de Araujo, 2014. vi, 40 f. ; 30 cm

Orientador: Joel Campos de Paula.

Coorientador: Fabiano Salgueiro.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

1. Alga parda - Análise. 2. Quimiodiversidade. 3. Cromatografia gasosa. 4. Espectrômetro de massas. 5. Diterpenos. 6. Filogenia. I. Paula, Joel Campos de II. Salgueiro, Fabiano. III. Universidade Federal do Estado do Rio Janeiro. Centro de Ciências Biológicas e de Saúde. Curso de Mestrado em Ciências Biológicas. IV. Título.

CDD – 579.8

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a muitas pessoas, que auxiliaram e de alguma forma participaram para que esse trabalho se realizasse.

Ao meu orientador, Dr. Joel Campos De Paula pela imensa ajuda, interminável paciência, idas ao campo de norte a sul do país sem perder o bom-humor... pelo auxílio na escrita, pelas conversas, pelo direcionamento e pela amizade nesses anos (todos!) de trabalho. Muito obrigada!

Ao meu orientador Dr. Fabiano Salgueiro por todo apoio e paciência. Pela grande (e indispensável!) ajuda nos trabalhos técnicos, de bancada, análises... Um “mundo” se abriu diante de mim.

Ao meu pai Henrique, por todo apoio, muitos conselhos e carinho.

Aos meus irmãos Karla e Fernando e sobrinhos, Ian e Aila pelo pensamento positivo, muitas horas de conversa e toda ajuda, vocês são os melhores do mundo!

A minha mãe Glória, minha fortaleza, por estar sempre do meu lado!

A toda minha família maravilhosa, que me apoia em todos os meus projetos, mesmo às vezes não entendendo muito bem do que se trata... Amo vocês!

Ao Rafa, pela ajuda em campo e por todo apoio, muito obrigada!

Aos meus amigos, que nunca abandonam... Tay Galvão, Vavá, Felipe Vizinho, Marcelo Ferreira, Lari Marques... Obrigada pelos sonhos compartilhados e toda ajuda em diversos momentos...

Obrigada a toda família do Labiotal/UNIRIO, muita sorte ter tantos amigos em um lugar só... Aline, Beta Pacheco, Erick, Flavinha... Aos agregados Gabi, Rodolfo e Vivi... Muito obrigada por toda ajuda em diversas etapas do trabalho, no campo, no laboratório, trocando idéias, vocês são maravilhosos!

Gostaria de agradecer também ao Dr. Marcelo Tappim da Fiocruz, pela parceria e infraestrutura fornecida, que possibilitou o desenvolvimento desse projeto. Obrigada também pela atenção e toda orientação ao longo desse período.

Ao prof. Dr. Rafael Fortes pela contribuição com os dados de herbívoros e no texto final do manuscrito.

A Dra. Beatriz Grosso Fleury pelo incentivo e apoio e por aceitar fazer parte da banca avaliadora deste trabalho.

A Dra. Diana Cavalcanti Negrão e Dra. Maria Beatriz Barbosa de Barros Barreto por aceitarem fazer parte da banca avaliadora deste trabalho.

Aos motoristas da UNIRIO Sr. João e Anderson... rodamos todo litoral do Brasil, enfrentamos alguns contratemplos mas deu tudo certo, graças a vocês... muito obrigada!!!

Ao apoio financeiro da FAPERJ (edital BIOTA 2012) e a CAPES pela bolsa de mestrado fornecida, ambos indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

A todos, Muito Obrigada!

Introdução

Os metabólitos secundários originários de macroalgas bentônicas, apresentam número bastante relevante (Blunt, *et al.* 2010) e, correspondem a cerca de 20% de todos os metabólitos secundários encontrados em organismos marinhos (Faulkner, 2000). As macroalgas pardas apresentam mais de 1.000 metabólitos secundários isolados, sendo a família Dictyotaceae a mais prolífica fonte, principalmente de terpenos (Maschek *et Baker*, 2008). São conhecidos aproximadamente 300 diterpenos, isolados de espécies coletadas em ambientes tropicais, subtropicais e temperados quentes de todo o mundo (Vallim *et al.*2005), sendo os gêneros *Dictyota* J. V. Lamouroux e *Canistrocarpus* De Paula *et. De Clerck* excelentes fontes destes compostos, apresentando propriedades biologicamente ativas (Teixeira *et Kelecom*, 1988; De Paula *et al.*2011).

Do ponto de vista químico, a síntese dos diterpenos é proposta pela rota biossintética do ácido mevalônico com a formação do precursor comum o geranylgeraniol, dando origem a diferentes grupos de esqueletos químicos (Fig.1). Dentre eles, o grupo I é formado a partir da primeira ciclização entre os carbonos 1 e 10, dando origem a uma série de produtos, como o guaiano prenilado, bastante comum entre as *Dictyota* (Fenical, 1980; Teixeira *et Kelecom*, 1989). O grupo II é formado pela primeira ciclização dos carbonos 1 e 11, e pode ser dividido nos grupos IIa e IIb. O grupo IIa é caracterizado pela produção de dolabellanos, dolastanos IIa e derivados, ocorrendo também nas algas do gênero *Dictyota* (Cavalcanti,1998). Os diterpenos de *Canistrocarpus* são do tipo dolastanos IIb e secodolastanos, estes ocorrem somente nas espécies deste gênero (Teixeira *et Kelecom* 1988; De Paula *et al.*, 2001; Oliveira *et al.*2008). Embora os grupos IIa e IIb apresentem esqueletos do tipo dolastanos não há registro de co-ocorrência de metabólitos destes dois tipos em uma mesma espécie, o que

demonstra a característica conservativa das linhagens metabólicas. Por fim, produtos do grupo III são originados pela ciclização do precursor entre os carbonos 2 e 10 e ocorrem simultaneamente na mesma espécie com produtos do grupo I típicos do gênero *Dictyota*.

Os grupos químicos oriundos do metabolismo secundário dessas algas apresentam-se distribuídos diferentemente nos oceanos, sendo 61% de estruturas de diterpenos com esqueleto dolastano, no Oceano Atlântico (Vallim *et al.* 2005).

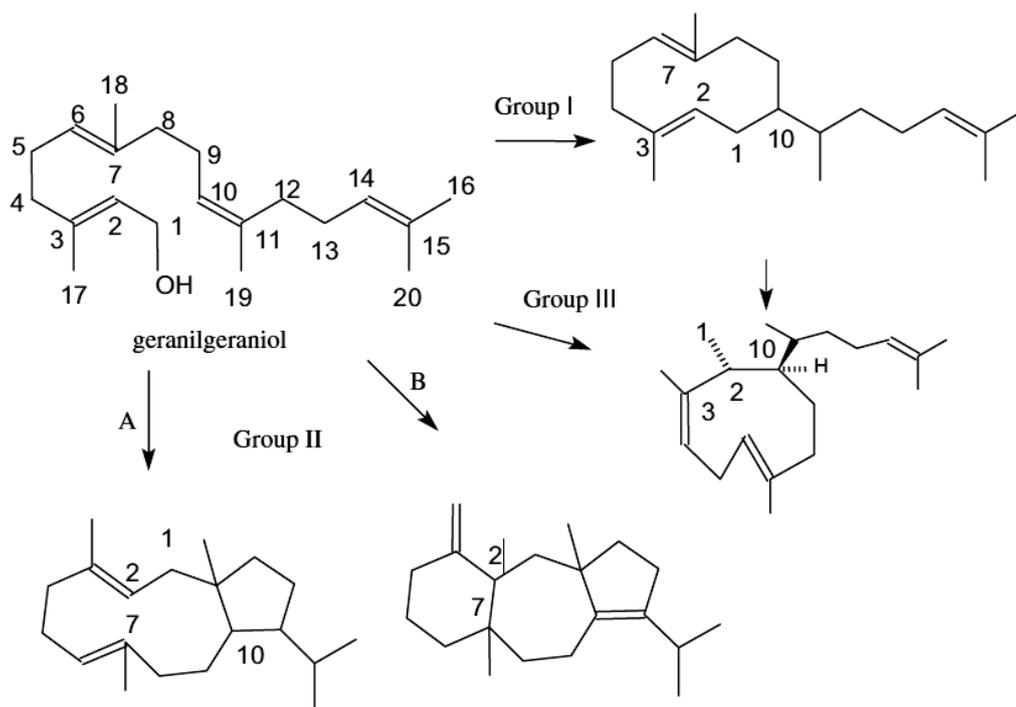


Fig.1. Esquema com proposta biossintética dos diterpenos dos gêneros *Dictyota* e *Canistrocarpus* segundo Vallim *et al.* (2005).

Os processos mediados pelos metabólitos secundários determinaram o sucesso dos organismos e o aumento da biodiversidade nos sistemas, sendo de fundamental importância adaptativa (Hay *et Fenical*, 1996), atuando ativamente nas interações

ecológicas. Uma das mais importantes funções desses metabólitos está associada à defesa química contra consumidores e competidores no ambiente, sendo descritos por diversos autores e estudados quanto ao seu potencial anti-herbivoria (Hay *et Fenical* 1988, Pereira *et al.* 2004, Vallim *et al.* 2007; Araujo, 2012), anti-incrustante (Da Gama *et al.* 2008; Bianco *et al.* 2009), alelopático, na competição por espaço (Bak *et al.* 1984; Aceret *et.al.*, 1995; Boyd *et al.*1999; Cetrulo *et al.* 2000; Box *et al.*, 2007; Birrel *et al.* 2008) e permitir o aumento no sucesso reprodutivo de alguns organismos (Sammarco *et Coll*, 1992; Boland, 1995), possibilitando a conquista de novos ambientes, por parte das macroalgas produtoras. Outras abordagens apontam para as características ambientais como fator preponderante na síntese diversificada de produtos naturais. Nesse contexto, fatores de estresse ambiental, como temperatura (Joshi *et al.*1975), luminosidade (Pavia *et al.* 1997), dessecação (Cronin *et Hay*, 1996), entre outros, podem ser capazes de influenciar o metabolismo secundário das macroalgas e portanto a síntese quantitativa desses produtos em questão, que pode ser bastante dinâmica. Já a variabilidade qualitativa desses compostos, representada pelos tipos de compostos presentes, tende a ser mais conservada (Masuda *et al.* 1997).

Alguns modelos foram propostos para explicar os padrões de variação e abundância de metabólitos secundários em macroalgas marinhas, entre eles está o Modelo de Defesa Ótima (MDO), que relaciona a produção de metabólitos de defesa com a pressão de herbivoria do ambiente, numa relação de custo-benefício, em detrimento da síntese de outros produtos ou realização de atividades como desenvolvimento e reprodução (Cronin, 2001). Já o Modelo da Variação Espacial de Consumidores (MVEC), postula que em áreas com maior impacto de herbivoria, plantas quimicamente defendidas são evolutivamente mais persistentes do que aquelas não

defendidas (Hay *et al.* Steinberg, 1992). Em ambientes de grande estresse, ocorre a diminuição na produção de metabólitos secundários e, portanto o aumento na susceptibilidade (e.g. doenças) desses organismos, sendo explicado esse fato pelo Modelo de Estresse Ambiental (MEA) (Cronin, 2001; Van Alstyne *et al.* 2001).

A espécie *Canistrocarpus cervicornis*, é conhecida por sintetizar diterpenos do tipo dolastanos Iib e secodolastanos (Teixeira *et al.* Kelecom 1988; De Paula *et al.* 2001, De Paula, 2007; Oliveria *et al.* 2008), e esses produtos apresentam diversas atividades biológicas como a interação com potenciais herbívoros (Pereira *et al.* 2002), como antiviral, incluindo o vírus da herpes humana e o vírus HIV-1 (Vallim *et al.* 2010), antibiótica, contra leishmaniose (Santos *et al.* 2011) e citotóxica representando desta forma uma fonte de recursos que podem ser explorados pela ciência e sociedade (De Paula *et al.* 2011).

As algas do gênero *Canistrocarpus*, devido a sua anatomia simples têm demonstrado ser de difícil identificação. A plasticidade fenotípica desse gênero também é um fator problemático na distinção entre suas espécies e outras macroalgas de grupos próximos, que também apresentam alta plasticidade (e.g. *Dictyota*). Portanto, se faz necessário o uso de ferramentas outras, para facilitar a identificação das espécies, como a biologia molecular e a química de produtos naturais, além da taxonomia tradicional. Ou seja, através das comparações entre as sequências de DNA, conhecimento de atributos morfológicos, que remete à técnica de “DNA barcoding” (Stoeckle, 2003), e ainda o perfil químico de produtos naturais do grupo, tornado possível a identificação de padrões mais específicos para cada entidade taxonômica, facilitando, portanto a descrição e até mesmo descoberta de novas espécies.

A descrição do gênero *Canistrocarpus*, cujas espécies estavam antes circunscritas no gênero *Dictyota*, foi obtida desta forma, integrando as ferramentas molecular e taxonomia morfológica sendo confirmadas pelas assinaturas químicas, únicas das espécies deste gênero (De Clerck *et al.* 2006). Diferenças moleculares, morfológicas (presença de coroa de células) e químicas (presença de diterpenos do grupo IIb - dolastanos e secodolastanos), formaram portanto este novo gênero, dando origem às novas espécies, *C. crispatus* (Lamouroux) De Paula *et* De Clerck, *C. magneanus* (De Clerck *et* Coppejans) De Paula *et* De Clerck e *Canistrocarpus cervicornis* (Kützinger) De Paula *et* De Clerck.

O presente estudo tem como objetivo avaliar o perfil químico e molecular de indivíduos de *Canistrocarpus cervicornis* correlacionando-os a anatomia da macroalga, identificando assim, variações biogeográficas ao longo da costa brasileira nesta espécie. Através dessas análises, foi possível verificar que existe uma ***Alta variabilidade química em populações de Canistrocarpus cervicornis (Dictyotaceae, Phaeophyceae) da costa brasileira em oposição à baixa diversidade morfológica e molecular,*** discutindo a influência de fatores ambientais na expressão fenotípica da macroalga estudada.

Referências

- Aceret, T. L., Sammarco, P. W. & Coll, J. C., 1995. Toxic effects of alcyonacean diterpenes on scleractinian corals. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 188: 63-78.
- Araujo J.M., 2012. Potencial de defesa química em algas pardas (Phaeophyceae) diante de consumidores de pequena e grande mobilidade. Monografia de Bacharelado. Instituto de Biologia. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. 55p.
- Bak, R.P.M.; Borsboom J.L.A., 1984. Allelopathic interaction between a reef coelenterate and benthic algae. *Oecologia* 63:194–198.
- Birrell C.L.; McCook L.J.; Willis B.L., 2008. Allelochemical effects of macroalgae on larval settlement of the coral *Acropora millepora*. *Mar Ecol Prog Ser* 362:129–137.
- Box, S.J.; Mumby, P.J., 2007. Effects of macroalgal competition on growth and survival of juvenile Caribbean corals. *Mar Ecol Prog Ser* 342:139–149.
- Bianco, E.M.; Rogers, R.; Teixeira V.L.; Pereira, R.C., 2009. Antifoulant diterpenes produced by the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis*. *J. Appl. Phycol.*, v. 21, p. 341–346.
- Blunt J.W.; Copp B.R.; Murray H.G.; Munro, P.T.; Northcote P.T.; Prinsep M.R., 2010. Marine natural products. *Nat Prod Rep Nat. Prod. Rep.* 27, 165–237.
- Boland, W., 1995. The chemistry of gamete attraction: Chemical structures, biosynthesis, and (a)biotic degradation of algal pheromones. "Chemical Ecology: The Chemistry of Biotic Interaction," Colloquium Paper Vol. 92, pp. 37-43.
- Boyd, K.G.; Adams, D.R.; Burgess, J.G., 1999. Antibacterial and repellent activities of marine bacteria associated with algal surfaces. *Biofouling* 14:227–236.
- Cavalcanti, D. N.; Bemfica, R. C.; Teixeira, V. L., 1998. Chemotaxonomy of Dictyotales (Phaeophyta): chemical similarity among populations of *Dictyota*. *Ann.*

- IV Congr. Latino-Americano, II Reunião Ibero-Americana e VII Reunião Brasileira de Ficologia. Vol. II, 245-255.
- Cetrulo G.L.; Hay M.E., 2000. Activated chemical defenses in tropical versus temperate seaweeds. *Mar Ecol Prog Ser* 207:243–253.
- Cronin, G., 2001. Resource allocation in seaweeds and marine invertebrates: chemical defense patterns in relation to defense theories. In: McClintock JB, Baker BJ, editors. *Marine chemical ecology*. Boca Raton: CRC Press. p.325–353.
- Cronin, G.; Hay, M. E., 1996. Within plant variation in seaweed palatability and chemical defenses: Optimal defense theory versus the growth differentiation balance hypothesis. *Oecologia*, Vol.105, pp. 361-368.
- Da Gama, B.A.P.; Santos, R.P.A.; Pereira, R.C., 2008. The effects of epibionts on susceptibility to herbivory and fouling of the red seaweed *Cryptonemia seminervis*. *Biofouling*, 24: 209-218.
- De Clerck, O.; Leliaert, F.; Verbruggen, H.; Lane, C. E.; De Paula, J. C.; Payo, D. A.; Coppejans, E., 2006. A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on *rbcL* and 26S ribosomal DNA sequence analyses. *J. Phycol.* 42: 1271-1288.
- De Paula J.C., 2007. Química e Morfologia de Espécies Brasileiras da Tribo Dictyoteae (Phaeophyceae) e Avaliação dos Diterpenos como Marcadores Taxonômicos. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 143p.
- De Paula J.C.; Pedrini A.G.; Pinheiro M.D.; Pereira R.C.; Teixeira V.L., 2001. Chemical similarity, between the brown algae *Dictyota cervicornis* and *D. pardalis* (Dictyotales, Phaeophyta). *Biochem Syst Ecol* 29: 425-427.
- De Paula, J. C.; Vallim, M. A.; Teixeira, V. L., 2011. What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). *Revista*

- Brasileira de Farmacognosia. 21(2): 216-228.
- Faulkner, D. J., 2001. Marine Natural Products. Natural Products Reports, 19 (1): 1-48.
- Hay, M. E. & Fenical, W., 1988. Marine plant-herbivore interactions: the ecology of chemical defense. Annual Review of Ecology and Systematics, 19:111-145.
- Hay, M. E.; Fenical W., 1996. Chemical Ecology and Marine Biodiversity: Insights and products from the sea. Oceanography, 9:10-20.
- Hay, M.E. & Steinberg, P.D., 1992. The chemical ecology of plant-herbivore interactions in marine versus terrestrial communities. In: Rosenthal, L., Berenbaum, M. (Eds.), Herbivores: Their Interaction with Secondary Plant Metabolites. Academic Press, New York, pp. 371-413.
- Joshi, G.V. and C.A. Gowda. 1975. Seasonal variations in chemical composition of *Sargassum ilicifolium* Grun. and sea water. Indian J. Mar. Sci. 4: 165-168.
- Maschek, J. A. & Baker, B. J., 2008. The chemistry of algal secondary metabolism. In Amsler, C. D. (ed.). Algal chemical ecology. Springer-Verlag. Berlin. pp. 1-23.
- Masuda M., Abe T., & Sato S. 1997. Diversity of halogenated secondary metabolites in the red alga *Laurencia nipponica* (Rhodomelaceae, Ceramiales). Journal of Phycology 33: 196-208.
- Oliveira AS, Cavalcanti DN, Bianco EM, De Paula JC, Pereira RC, Yoneshigue-Valentin Y & Teixeira VL (2008) Chemical composition of diterpenes from the brown alga *Canistrocarpus cervicornis* (Dictyotaceae, Phaeophyceae). Natural Product Communications, 3(9):1469-1472.
- Pavia, H.; Cervin, G.; Lindgren, A.; Aberg, P. 1997. The effect of UV-B radiation and simulated herbivory on the production of phlorotannins in the brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. Mar Ecol Prog Ser, 157: 139-146.

- Pereira R.C., Soares A.R., Teixeira V.L., Villaça, R.C. et Da Gama B.A.P. 2004. Variation in chemical defenses against herbivory in southwestern Atlantic *Styopodium zonale* (Phaeophyta). *Botanica Marina* 47: 202–208
- Sammarco, P.W. and J.C. COB, 1992. Chemical adaptations in the Octocorallia: Evolutionary perspectives. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, Vol. 88, pp. 93-104.
- Santos A.O., Britta E.A., Bianco E.M., Ueda-Nakamura T., Dias Filho B.P., Pereira R.C. et Nakamura C.V. 2011. 4-Acetoxydolastane Diterpene from the Brazilian Brown Alga *Canistrocarpus cervicornis* as Antileishmanial Agent. *Mar. Drugs* 9, 2369-2383; doi:10.3390/md9112369
- Stoeckle M. (2003). Taxonomy, DNA, and the bar code of life. *BioScience*, 53: 796-797.
- Teixeira, V.L. & Kelecom, A. 1988. A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown algae of the genus *Dictyota*. *Sci. Tot. Environ.*, 75: 271 - 283.
- Teixeira, V. L., & Kelecom, A. 1989. Chemotaxonomy of Dictyotales (Phaeophyta). 2. The “Dictyota” group. *Insula*. 19: 249-270.
- Vallim, M.A., De Paula, J.C., Pereira, R.C., Teixeira, V.L. 2005. The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical Atlantic American region. *Biochemical systematic and ecology*, 33: 1-16
- Vallim, M. A.; Teixeira, V. L. & Pereira, R. C. 2007. Feeding-deterrent properties of diterpenes of *Dictyota mertensii* (Phaeophyceae, Dictyotales). *Brazilian Journal of Oceanography*, 55: 223-229.
- Vallim M.A.; Barbosa J.E.; Cavalcanti D.N.; De Paula J.C.; Silva, V.A.G.G.; Teixeira V.L.; Paixão I.C.N.P. 2010. In vitro antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. *J Med Plant Res* 4: 2379-2382.

Van Alstyne K. L.; Dethier M. N.; Duggins D. O. 2001. Spatial patterns in macroalgal chemical defenses. In: MCCLINTOCK, J. B.; BAKER, B. J. (Ed.). *Marine Chemical Ecology*. Boca Raton, Fla: CRC, p. 301-324.

**Alta variabilidade química em populações de *Canistrocarpus cervicornis*
(Dictyotaceae, Phaeophyceae) da costa brasileira em oposição à baixa diversidade
morfológica e molecular.**

J. M. Araujo^a, M. R. R. Tappin^b, E. A. P. Lopes-Filho^c, R. R. Fortes^c, F. Salgueiro^a, J. C.
De Paula^{a*}.

^aPrograma de pós-graduação em Biodiversidade Neotropical, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Av. Pasteur 458, 409 CEP:22290-255, Rio de Janeiro Brasil.

^bFundação Oswaldo Cruz; ^cInstituto de Biologia, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Av. Pasteur 458, CEP:22290-255, Rio de Janeiro Brasil.

*Autor para correspondência: depaula.joelc@gmail.com

Resumo

Três populações da alga parda *Canistrocarpus cervicornis* afastadas entre si por até 1800 quilômetros, foram quimicamente analisadas através de Cromatografia Gasosa acoplada a um Espectrômetro de Massas (CG/EM). Os extratos brutos em acetato de etila forneceram um total de treze diterpenos detectáveis, baseados no esqueleto dolastano. A comparação dos padrões de fragmentação com dados disponíveis na literatura permitiu a confirmação do diterpeno 4,7-diacetoxi-14-hidroxi-dolastano-1(15),8-dieno como produto majoritário em todas as populações. Apesar da coincidência do produto mais abundante, uma significativa variação quantitativa deste e dos demais produtos foi detectada entre as três populações. A plasticidade encontrada do ponto de vista químico não acompanhou a morfologia que manteve um padrão conservado em toda a costa. De maneira similar sob o ponto de vista molecular, baseando-se nos genes plastidial *rbcL* e mitocondrial *nad1*, não foram registradas variações significativas entre as populações brasileiras e apenas uma variação muito pequena entre populações transoceânicas.

Palavras-chave: quimiodiversidade, *rbcL*, *nad1*, CG/EM, diterpenos, filogenia.

Abstract

Three populations of the brown seaweed *Canistrocarpus cervicornis* spaced up to 1800 km, were chemically analyzed by Gas Chromatography coupled to a Mass Spectrometer (GC / MS). The crude extracts (ethyl acetate) provided a total of thirteen detectable diterpenes based dolastane skeleton. The analysis of fragment patterns allowed the identification of diterpenoid 4,7-diacetoxy-14-hydroxidolastano-1 (15), 8-diene as the major product in all populations. A high variation on the concentration of this and other products was detected among the three populations. The phenotypic plasticity found in chemical data did not found correspondence with morphology that exhibited a conserved pattern along the coast. In a similar way, the molecular data based on plastid genes *rbcL* and mitochondrial *nad1* shows no difference between Brazilian population and little molecular transoceanic variations.

Key words: chemodiversity, *rbcL*, *nad1*, GC/MS, diterpenes, phylogeny.

Introdução

Estudos químicos sobre os produtos naturais de algas da família Dictyotaceae demonstram uma alta riqueza de metabólitos e uma fonte importante de diterpenos biologicamente ativos [1]. Em destaque, estes diterpenos têm sido relatados como produtos de defesa e sinalização química [2,3,4], podendo ainda apresentar atividades citotóxica, antiviral e antibiótica, sendo fonte de recursos interessantes para a ciência e sociedade [1]. Assim como o sequenciamento molecular, que têm revolucionado a sistemática de macroalgas desde a sua primeira aplicação na década de 1990 [5], os produtos naturais podem também atuar como marcadores taxonômicos [6,7]. A descrição do gênero *Canistrocarpus* De Paula *et. De Clerck*, cujas espécies antes pertenciam ao gênero *Dictyota* J. V. Lamouroux foi baseada em dados morfológicos e moleculares, bem como confirmada pelas assinaturas químicas que são únicas das espécies deste gênero [8]. Diferenças moleculares, morfológicas (presença de coroa de células circundando os esporângios) e químicas (presença de diterpenos do grupo I Ib - dolastanos e secodolastanos), formaram portanto este novo gênero, composto pelas espécies, *C. crispatus* (Lamouroux) De Paula *et De Clerck*, *C. magneanus* (De Clerck *et Coppejans*) De Paula *et De Clerck* e *Canistrocarpus cervicornis* (Kützinger) De Paula *et De Clerck*. Esta última apresenta ampla distribuição por regiões trans-oceânicas, estando presente em toda a costa brasileira [9]. Investigações a cerca de espécies de macroalgas como esta, cosmopolitas, podem oferecer *insights* sobre processos evolutivos e ecológicos no ambiente bentônico marinho [10,11]. A baixa diversidade genética entre populações distintas geralmente é relacionada a processos de dispersão contemporâneos ou invasões, enquanto a alta diversidade genética reflete o efeito de eventos históricos que provocam descontinuidades nas populações e isolamentos geográficos [12]. No presente estudo, foram coletados indivíduos de *C. cervicornis* de

três diferentes localidades na costa brasileira. As algas foram analisadas através do método de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectometria de Massas (CG/EM), obtendo produtos naturais que são comumente utilizados para fins quimiotaxonômicos [13, 14, 15, 16,17], associado ao estudo molecular baseado nos genes plastidial *rbcL* e mitocondrial *nad1*. Desta forma, o estudo registra as variações das características morfológicas, químicas e moleculares dos espécimes de *C. cervicornis* em relação à variação biogeográfica, que abrange cerca de 14 graus de latitude cobrindo 1800 quilômetros da costa oeste do Oceano Atlântico Sul perpassando pelas zonas tropical e temperada quente segundo a classificação de ecoregiões marinhas [18]. A população mais ao sul pode ser também considerada como pertencente a uma região dessa área de transição (ecótono) entre a região tropical ao norte e temperada quente mais ao sul. A área de transição entre essas diferentes ecoregiões é reconhecida como uma barreira biogeográfica à grande parte da flora de macroalgas da costa oeste do Atlântico Sul [19], mas é também dentro desse ecótono que ocorre uma grande diversidade de organismos com afinidades tropicais e temperadas [20].

Materiais e métodos

Amostragem

Espécimes de *Canistrocarpus cervicornis* foram coletados no inverno de 2012 em três diferentes regiões ao longo da costa do Brasil (oeste do Atlântico-sul), nas seguintes localidades: (1) Prainha (22°57'6"S e 42°0'14"W), Arraial do Cabo, Rio de Janeiro (RJ); (2) Praia da Penha (12 59' 27" S e 38 37' 29" W), Santa Cruz, Bahia (Ba); (3) Muro Alto (08 25' 45"S e 34 58' 40' W), Ipojuca, Pernambuco (Pe). As localidades estão separadas por cerca de 1380 Km (1-2) e 475 Km (2-3), sendo a distância total aproximadamente de 1800 Km. As algas foram coletadas em profundidades que variaram entre 1 a 2 metros na coluna d'água. Os indivíduos utilizados no estudo estão depositados no herbário da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro - HUNI. Os indivíduos de *C. cervicornis* coletados em cada localidade, foram separados em três partes sendo a primeira seca em sílica gel e levada ao laboratório para análise química, a segunda, também seca em sílica gel e congelada em freezer -80°C para análise molecular e a última fixada em solução de formalina 4% para estudos taxonômicos. Dados de herbivoria foram coletados em bases de dados disponíveis na *internet* (e.g. *fishbase*).

Análise Morfológica

As análises morfológicas foram baseadas nas medidas obtidas de cada indivíduo de diferentes populações, tais como, o comprimento total e largura do talo, medidas celulares através de cortes histológicos no ápice, meio e na base das algas, com auxílio de lâmina de aço e microscópio estereoscópio Olympus CX40, dos quais foi possível mensurar a altura e largura das células corticais e medulares. Além das medidas foram realizadas observações a cerca da coloração, tipo de ramificação, forma do ápice,

presença de proliferações e verificação do estágio de vida das algas, para avaliação da variabilidade morfológica dos indivíduos nas populações estudadas.

Análise Química

Extração

Vinte miligramas de massa seca de cada indivíduo, sendo utilizados três indivíduos por população amostrada, foram macerados com pistilo em microtubos de 2 mL e adicionado 1,5 mL de acetato de etila (C₄H₈O₂), a mistura foi levada para extração em ultrassom de imersão por 10 minutos à temperatura ambiente (25 °C). O extrato obtido foi filtrado em membrana de celulose regenerada Minisart® RC15, com malha de 0.45 µm. O extrato bruto obtido apresentou coloração que variou do verde claro ao verde oliva.

Análise CG / EM:

As análises foram realizadas em Cromatógrafo ©Agilent em fase gasosa modelo 6890n acoplado a espectrômetro de massas modelo 5973n com injetor automatizado modelo 7683, equipado com coluna db-5ms 30m 0.250 mm de diâmetro interno e 0.250 µm de espessura de filme. O gás carreador foi hidrogênio ao fluxo de 1,3 mL/ min. As amostras foram injetadas com divisão de fluxo (*Split*), na razão de 1:10. O método empregou temperatura inicial de 141°C com taxa de aquecimento (rampa) de 2,74°C/ min. até atingir 278°C por 50 minutos. As temperaturas do injetor e detector foram fixadas a 270°C e 325°C, respectivamente. Foram feitas 4 réplicas por amostra injetada, de 3 indivíduos por população (RJ, BA, PE). Os cromatogramas gerados foram

analisados com auxílio do software Open Chrome® para detecção dos produtos de interesse em cada indivíduo/população. Os espectros de massas obtidos foram comparados com os contidos na biblioteca Wiley (~229.000 espectros) sem correspondência acima de 20%.

Tratamento dos dados

O extrato bruto submetido ao CG/EM forneceu as áreas dos picos cromatográficos correspondentes a cada diterpeno e aqui tratada como abundância relativa de cada produto. A média das áreas das réplicas correspondentes a cada produto detectado foi submetida à Análise de Componentes Principais no software Primer® 6, versão 6.1.13, buscando ilustrar as diferenças populacionais de *C. cervicornis* nas diferentes localidades amostradas. Foi realizada também uma análise de variância, seguida do teste de *Dunn* no software SigmaPlot® versão 11, para verificar a significância da diferença dos produtos naturais entre populações. Apenas os 13 produtos mais abundantes para cada população foram utilizados nesta análise, uma vez que os demais produtos não puderam ser claramente distinguidos da linha de base da cromatografia.

Análise Molecular

O DNA genômico total de *C. cervicornis* foi extraído seguindo uma versão modificada do protocolo 2X CTAB (brometo de trimetil-hexadecil amônio catiônico), descrito por De Clerck *et al.* (2001) [21]. O DNA total foi usado para amplificação de fragmentos de DNA mitocondrial (subunidade NADH desidrogenase1 -nad1) e plastidial (subunidade maior da 1,5 Ribulose bifostafo-carboxilase/oxigenase-RuBiSCO LSU - rbcL) através

da reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR), segundo protocolo adaptado de Tronholm *et al.* 2010 [22]. Os genes mitocondrial e plastidial foram amplificados e sequenciados utilizando os *primers* descritos por Tronholm *et al.* 2010 [22]. A edição, alinhamento e análise filogenéticas de Máxima Verossimilhança (ML) foram realizadas no software MEGA6 [23]. A ML, contendo 13 sequências e correspondendo a 7 táxons, utilizou o modelo de substituição nucleotídico de Kimura-2-parameter e método de busca heurística de Nearest-neighbor-interchange (NNI) com 1000 replicações de bootstrap.

Resultados e Discussão

Diversos estudos que pretendem elucidar a variação química de espécies em diferentes populações, não apresentam de fato informações muito robustas, porque geralmente as avaliações realizadas se baseiam em extratos obtidos a partir de uma massa coletiva de muitos indivíduos da mesma espécie. Este estudo representa um refinamento nas análises, com a obtenção dos dados de abundância relativa obtidos de cada espécime dentro de cada população. Esses produtos naturais foram identificados através da comparação dos padrões de fragmentação de seus espectros de massa com os da literatura disponível [24].

Os espectros de CG/EM dos extratos brutos das três populações amostradas revelaram a presença de 13 principais produtos, que são compartilhados entre todos os indivíduos dentro de todas as populações geográficas o que reafirma o importante papel dos produtos naturais como marcadores taxonômicos [6]. O mesmo produto majoritário com tempo de retenção de 33,36 minutos (produto 9) na Tabela 1 foi encontrado nas três populações, sendo este o diterpeno 4,7-diacetoxi-14-hidroxiolastano-1(15),8-dieno (Fig.1) confirmado através da comparação dos padrões de fragmentação com dados disponíveis na literatura [4,24,25,26]. O produto com tempo de retenção de 29,32 minutos (produto 7) foi o segundo mais abundante em todas as populações. A abundância relativa média dos dois produtos majoritários na população mais ao norte da zona tropical diferiu significativamente ($p < 0,01$) das outras duas populações. Ao norte da zona tropical (Pe) a abundância relativa do produto majoritário é cerca de, 2,8 vezes maior do que na população 475 Km ao sul (Ba) e cerca de 8,1 vezes maior quando se trata do segundo produto mais abundante. Em relação à população austral (RJ) à 1800 km, as algas ao Norte da Zona Tropical apresentaram cerca de 2,5 vezes maior

abundância do majoritário e 2,9 vezes mais do segundo produto majoritário. Os demais produtos estiveram presentes em menor quantidade ou apresentaram apenas algum traço nos extratos brutos estudados (Tabela 1).

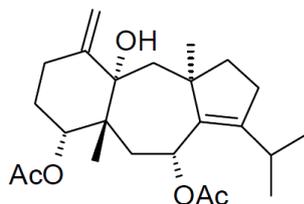


Fig.1. Estrutura proposta para o produto majoritário o diterpeno 4,7-diacetoxi-14-hidroxi-15,8-dieno segundo Bianco *et al.* (2010) [4].

Tabela 1: Diterpenos de *Canistrocarpus cervicornis* separados em Tempos de Retenção (RT) e suas respectivas abundâncias relativas (somatório da abundância dos produtos representativos =100%).

Produto	*RT	RJ	Ba	Pe
1	23,06	t	t	t
2	27,52	o	t	o
3	27,80	t	t	t
4	27,97	t	t	t
5	28,20	o	t	t
6	28,77	o	o	t
7	29,32	p	p	p
8	32,88	o	t	t
9	33,36	m	m	m
10	33,56	t	t	t
11	34,16	a	t	p
12	34,44	o	t	t
13	35,11	t	_t	o

* RT = tempo de retenção dos produtos, em minutos. m = majoritário (>40%), a = abundante (20-40%), p = presente (20-8%), o = ocasional (2-7%), t = traço (<2%).

Produtos mais abundantes em negrito.

A PCA [27,28] mostrou que as populações apresentam-se desiguais com relação principalmente à abundância relativa do majoritário (produto 9) e o segundo majoritário, (produto 7). Elevadas abundâncias relativas destes dois produtos influenciaram a posição das populações Tropicais ao longo do eixo 1 da PCA (Fig.2). Embora distando menos de 500 km a população de Pe apresentou a maior abundância relativa dos produtos 9 e 7 enquanto Ba apresentou as menores abundâncias. O eixo 1 foi positivamente influenciado pela abundância dos dois produtos citados acima enquanto o eixo 2 foi influenciado positivamente pela abundância relativa do produto 11, muito abundante na população da zona Temperada Quente (Tabela1). A população da região Temperada Quente (RJ) apresentou característica singular na qual a abundância relativa de um número maior de produtos faz com que esta população se destaque das outras duas (Quadro 1 e Fig.2). Esta população, por estar situada na borda entre as zonas Tropical e Temperada Quente, sendo pertencente a um ecótono [29]. Desta forma, estaria submetida a uma maior variabilidade ambiental e assim, provavelmente uma maior abundância relativa de outros produtos [30]. Nossos dados parecem corroborar com esta possibilidade, embora um nítido padrão quanto a maior abundância relativa do majoritário na zona Tropical não tenha sido encontrado.

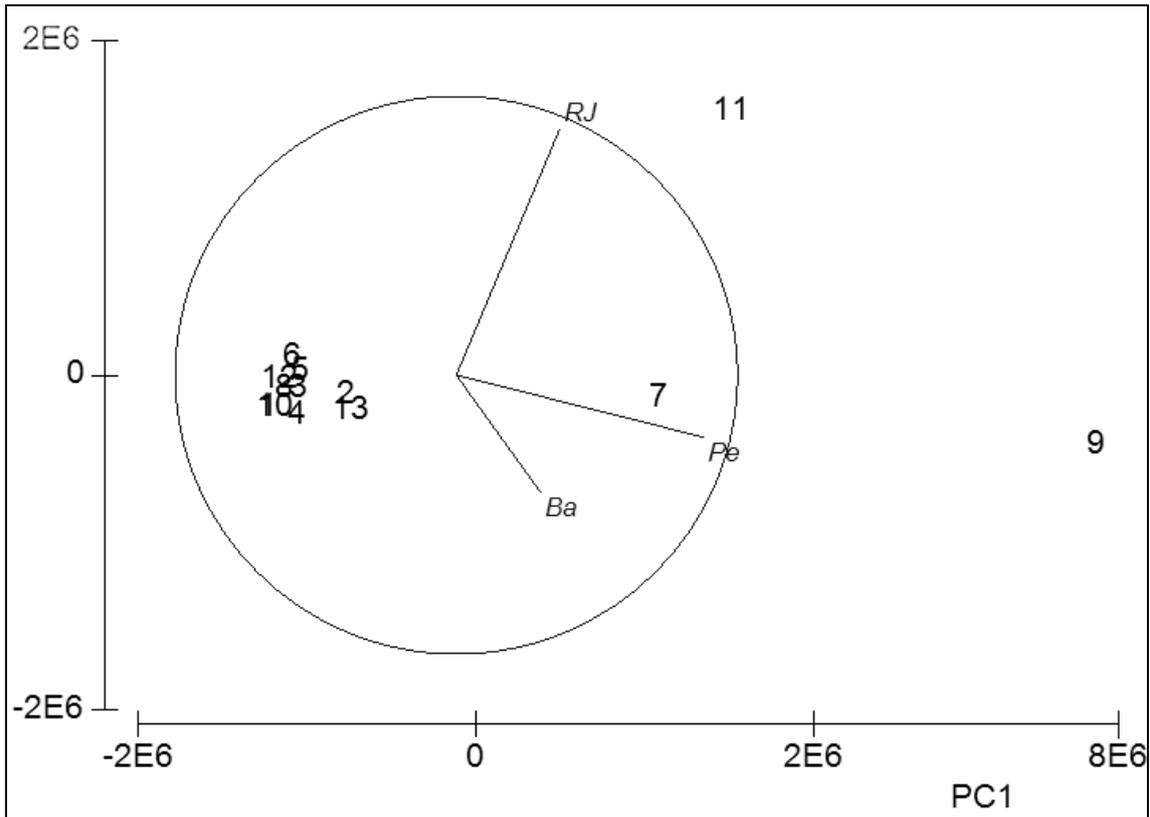


Fig.2. Análise de componentes principais (PCA): projeção discriminatória dos produtos encontrados, para as três populações amostradas: Tropical (Ba) Bahia e (Pe) Pernambuco e Temperada Quente (RJ) Rio de Janeiro.

A síntese quantitativa de produtos naturais pode ser bastante dinâmica, podendo sofrer influência de fatores ambientais, em contraste com o processo de variabilidade qualitativa (tipos de produtos presentes) que tende a ser mais conservador [10]. Segundo os parâmetros observados e mensurados, os locais não apresentaram diferenças quanto à dinâmica de ondas, salinidade, profundidade de coleta e turbidez (dados suplementares), que poderiam induzir a plasticidade química encontrada. A temperatura relacionada à população da zona Temperada Quente se mostrou inferior a das outras populações, inseridas na zona Tropical. A diferença de temperatura corrobora a hipótese de que diferentes condições ambientais possam contribuir para a variabilidade na abundância

de produtos naturais entre localidades diferentes [31]. A população da zona Temperada Quente apresentou maior diversidade de produtos naturais, representada pela abundância mais equitativa entre esses, sendo 41% representada pelo majoritário e outros 59% distribuídos pelos demais produtos encontrados. Nas demais populações o majoritário representou mais da metade da abundância de todos os produtos (84% na Bahia e 57% em Pernambuco), que pode ser reflexo da temperatura mais elevada, encontrada nessas localidades. O fator estresse de temperatura é preponderante sobretudo na região de Arraial do Cabo, RJ, que sofre influência do fenômeno da ressurgência, na qual o afloramento da ACAS (Água Central do Atlântico Sul), na plataforma continental, diminui significativamente a temperatura da água, principalmente nas estações de primavera e verão [32]. As coletas foram realizadas no inverno em todas as localidades, para minimizar a influência da variação de temperatura. No inverno em Arraial do Cabo, os ventos nordeste diminuem de intensidade e a ACAS recua em direção a margem da plataforma, tornando a distribuição da temperatura na zona costeira, mais homogênea, com águas entre 20°C e 25°C. Segundo Joshi *et al.*(1975) [33], a temperatura é capaz de influenciar o metabolismo secundário das macroalgas, desta forma, talvez a influência da ACAS possa se perpetuar sobre as populações locais (mesmo no período intermediário entre um fenômeno e outro), em relação ao metabolismo secundário de *C. cervicornis*, refletindo em uma maior diversificação de produtos, e em consequência uma maior abundância desses, conforme observado na Figura 3.

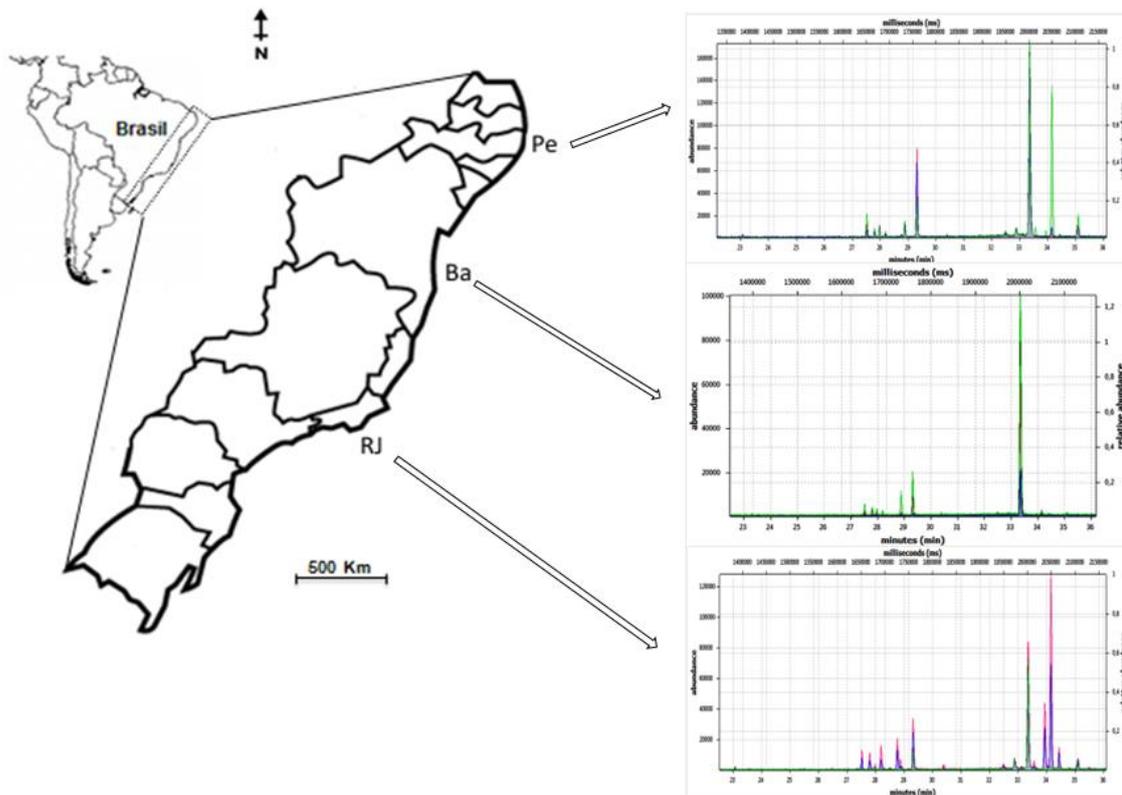


Fig. 3. Mapa da costa brasileira ilustrando as populações geográficas e seus respectivos cromatogramas, apresentando a diversidade e abundância dos produtos naturais encontrados. Sendo o cromatograma representativo da população tropical mais ao norte, Pernambuco (Pe); cromatograma representativo da população Tropical mais ao sul, Bahia (Ba); (c) cromatograma representativo da população Temperada Quente (ecótono) Rio de Janeiro (RJ). (Tempo de retenção entre 27,4 minutos e 35,15 minutos).

Os produtos naturais apresentam diversas funções, entre elas se destaca a de defesa para os organismos que os produzem [34]. Sendo assim a variabilidade dos metabólitos secundários também pode estar associada à pressão de herbivoria sofrida no ambiente. Esta hipótese foi analisada correlacionando a abundância total dos produtos naturais à abundância de peixes herbívoros que ocorrem na plataforma continental (batimetria até 200m de profundidade). A família Pomacentridae é a mais representativa em número de

espécies, estando fortemente relacionada aos costões rochosos e recifes em profundidades compatíveis àquela de ocorrência de *C. cervicornis*. A população de Pernambuco que possui maior abundância relativa de produtos e também do majoritário, está localizada na região de maior riqueza de espécies destes peixes entre as populações estudadas. Para a Bahia foi apresentada grande riqueza de peixes herbívoros, sobretudo de Pomacentridae, semelhante a Pernambuco. Apesar da abundância de seus produtos ter sido cerca de três vezes menor que a encontrada na população Tropical mais ao norte (Pe). É notável a abundância relativa superior do majoritário na população da Bahia, que representa sozinho 84% da abundância total de seus produtos, o que pode ser um indício de que essa substância sozinha atue de forma efetiva contra a herbivoria por peixes na zona Tropical. Rhoades, (1979)[35] postula que o organismo só produz defesas de forma diretamente proporcional ao risco de predação numa relação de custo-benefício (Modelo de Defesa Ótima), em detrimento de outras substâncias ou atividades. Na presença de predadores, o nível de defesa pode ser maior e direcionado, podendo explicar a variação entre populações e entre indivíduos de uma mesma população [36]. Hay *et* Steinberg (1992) [37], apresentam o Modelo da Variação Espacial de Consumidores no qual assumem que em áreas com maior impacto de herbivoria, plantas quimicamente defendidas são evolutivamente mais persistentes do que aquelas não defendidas. Ou seja, macroalgas de ambientes com forte pressão de herbivoria são potencialmente mais atacadas e, por isso, mais defendidas.

De maneira análoga, entre as três populações, aquela localizada mais ao sul, na zona Temperada Quente (RJ), apresentou abundância do produto majoritário cerca de duas vezes menor que Pernambuco, e ao mesmo tempo, maior variedade de produtos em maior concentração. A população da região Temperada Quente (ecótono) pode não estar submetida à predação por uma maior diversidade de peixes herbívoros, mas a uma

maior variabilidade ambiental (temperatura) ou diversidade de herbívoros de outros filos cujos dados precisam ser explorados.

Outro fator gerador de diferenças do ponto de vista químico entre populações seria a estrutura etária ou fase da vida dos espécimes estudados, no entanto, só foram utilizados nesse estudo indivíduos adultos e esporofíticos, portanto podemos excluir idade e estágio de vida como fonte de variação, no presente trabalho.

Os genes utilizados, *nad1* (mitocondrial) e *rbcL* (plastidial), não exibiram diferenças moleculares que pudessem fornecer alguma estrutura populacional separando as três populações analisadas. Foi observada uma substituição para o gene *nad1*, em um indivíduo apenas, na população de Pernambuco, mas pelo fato de estar em uma região microssatélite, ela não foi considerada nesta análise. Entre as populações de *C. cervicornis* do Atlântico Sul Oeste (Brasil), e a população da costa Leste do Oceano Atlântico Norte (Ilhas Canárias), houve apenas 3 sítios polimórficos para o gene *nad1* em 686pb analisados (p distance= 0,000). Entre *C. cervicornis* do Atlântico Sul Oeste (Brasil) e amostras das Filipinas também foram observados apenas 3 sítios com polimorfismo para o gene *rbcL* com 1553pb analisados (p distance= 0,002). Na comparação com a amostra do Oceano Índico (Tanzânia), foram encontrados 9 sítios polimórficos, também para o gene *rbcL* (p distance= 0,005). Entretanto os dados foram capazes de separar *Canistrocarpus cervicornis* de *C. crispatus*, duas espécies muito próximas do ponto de vista morfológico. Considerando o gene *rbcL*, as duas espécies cogenéricas apresentaram 74pb (p distance= 0,1) divergentes quando comparadas amostras do Atlântico Sul Oeste (Brasil) e do Leste do Oceano Atlântico Norte (Canárias). Em relação ao gene *nad1*, estas duas espécies apresentaram entre si apenas 15pb de diferença para as mesmas localidades. Em relação à *Dictyota dichotoma*, espécie típica do gênero, na análise feita com o gene *rbcL* (1081pb) houve 113 sítios

variantes. Desta forma, foi possível verificar não só a separação entre as espécies de *Canistrocarpus*, mas ressaltar também a diferença quantitativa de locos polimórficos entre os diferentes gêneros (Fig. 4).

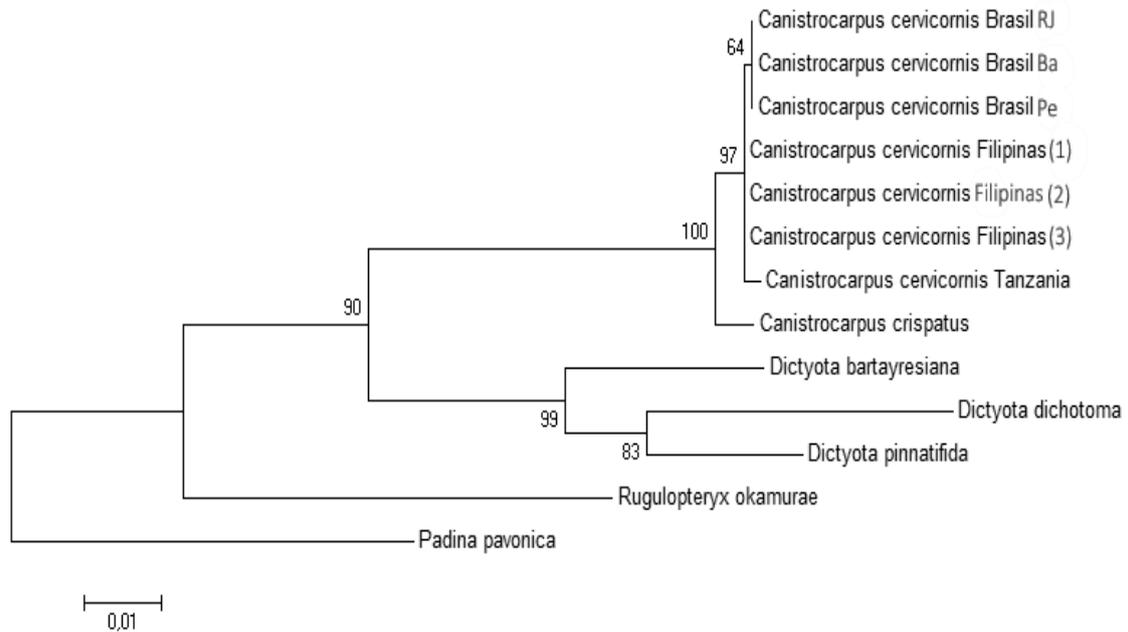


Fig 4. Árvore filogenética baseada no gene *rbcL*, obtida por Máxima Verossimilhança. Números nos nós indicam valores de *bootstrap* (1000 replicações). Grupos externos utilizados para enraizar a árvore (*Outgroups*): *Dictyota spp*, *Rugulopteryx okamurae*, *Padina pavonica*.

As observações e medidas feitas nos indivíduos das três populações amostradas demonstraram um mesmo padrão em relação às características morfológicas. Quanto ao estágio de vida, as algas da ordem Dictyotales apresentam ciclo de vida haplodiplobionte, com fase esporofítica e gametofítica isomórficas [38]. Neste estudo talos gametofíticos não foram observados. Esta ausência foi também verificada por outros autores [39,40]. Para este último autor, a ausência de talos gametofíticos sugere que a persistência das populações deve ser dependente da reprodução assexuada e que

pode haver apomeiose, o que levaria a formação de populações esporofíticas consecutivas sem a ocorrência de gametófitos. Outras Dictyotales como *Padina pavonica* (Linnaeus) Thivy já apresentaram este comportamento reprodutivo em cultivo [41]. Desta forma, a notável variação química registrada entre as populações contrasta com a ausência de variação genética para os genes *rbcL* e *nad1* e a monótona morfologia que praticamente não variou.

O uso do CG/MS permitiu acessar a quimiodiversidade quali-quantitativa de diterpenos em populações de *Canistrocarpus cervicornis* geograficamente distantes. Esta abordagem foi acompanhada do uso de marcadores moleculares e morfológicos. Estes dois últimos mostraram-se altamente conservados enquanto os produtos naturais apresentaram grandes variações quantitativas. Variações ambientais são evocadas para explicar as diferenças quanto à expressão química encontrada entre as populações.

Agradecimentos

A Roberta Pacheco Silva e Samara Ribeiro da Silva, pelo auxílio no laboratório de biologia molecular e alinhamento de sequências. A Dra Silvia Mattos Nascimento pelas considerações na parte escrita. Este estudo foi realizado em colaboração com a Plataforma de métodos analíticos (Espectrometria de massas e cromatografia) PDTIS - FIOCRUZ. Agencia financiadora, FAPERJ pelo edital BIOTA 2012 e CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Referências

- [1] De Paula, J.C. Vallim, M.A. *et* Teixeira, V.L. What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 21(2) (2011) 216-228.
- [2] Fleury, B.G. Kelecom, A. Pereira, R.C. *et* Teixeira, V.L. Polyphenols, terpenes and sterols in Brazilian Dictyotales and Fucales (Phaeophyta). *Bot. Mar.* 37 (1994) 457-462.
- [3] Paul, V. Cruz-Rivera, J.E. *et* Thacker, R.W. Chemical Mediation of Macroalgal Herbivore Interactions: Ecological and Evolutionary Perspectives. *Mar. Chem. Ecol.* (2001) 227-265.
- [4] Bianco, E.M. Teixeira, V.L. *et* Pereira, R.C. Chemical defenses of the tropical marine seaweed *Canistrocarpus cervicornis* against herbivory by sea urchin. *Braz. J. Oceanogr.* 58 (2010) 213-218.
- [5] Saunders, G.W. *et* Druehl, L.D. Nucleotide sequences of the small-subunit ribosomal RNA genes from selected Laminariales (Phaeophyta) – implications for kelp evolution. *J. Phycol.* 28 (1992) 544–549.
- [6] Kelecom, A. *et* Teixeira, V.L. Diterpenes of marine brown algae of the family Dictyotaceae: their possible role as defense compounds and their use in chemotaxonomy. *Sci. Total Environ.* 58 (1986) 109-115.
- [7] De Paula, J.C. Bueno, L.B. Cavalcanti, D.N. Yoneshigue-Valentin, Y. *et* Teixeira, V.L. Diterpenes from the brown alga *Dictyota crenulata*. *Molecules*, 13 (2008) 1238-1245.
- [8] De Clerck, O. Leliaert, F. Verbruggen, H. Lane, C.E. De Paula, J.C. Payo, D.A. *et* Coppejans, E. A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on *rbcL* and 26S ribosomal DNA sequence analyses. *J. Phycol.* 42 (2006)

1271-1288.

- [9] Széchy, M.T.M. *et* De Paula, J.C. Phaeophyceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: (2014) ><http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB104454>.
- [10] Masuda, M. Abe, T. *et* Sato, S. Diversity of halogenated secondary metabolites in the red alga *Laurencia nipponica* (Rhodomelaceae, Ceramiales). J. Phycol. 33 (1997) 196–208.
- [11] Boo, G.H. Mansilla, A. Nelson, W. Bellgrove, A. *et* Boo, S.M. Genetic connectivity between trans-oceanic populations of *Capreoliainplexa* (Gelidiales, Rhodophyta) in cool temperate waters of Australasia and Chile. Aquat. Bot. 119 (2014) 73–79.
- [12] Fraser, C. Thiel, M. Spencer *et* H. Waters, J. Contemporary habitat discontinuity and historic glacial ice drive genetic divergence in Chilean kelp. Evol. Biol. 10 (2010) 203.
- [13] Le Lann, K. Kervarec, N. Payri, C.E. Deslandes, E. *et* Stiger-Pouvreau, V. Discrimination of allied species within the genus *Turbinaria* (Fucales, Phaeophyceae) using HRMAS NMR spectroscopy. Talanta 74 (2008) 1079-1083.
- [14] Le Lann, K. Kraffe, E. Kervarec, N. Cerantola, S. Payri C.E. *et* Stiger-Pouvreau, V. Isolation of turbinaric acid as a chemomarker of *Turbinaria conoides* (J. Agardh) Kützing from South Pacific islands. J. Phycol. (in press) DOI: 10.1111/jpy.12235.
- [15] Amico, V. Marine brown algae of family Cystoseiraceae: chemistry and chemotaxonomy. Phytochem. 39 (1995) 1257-1279.

- [16] De Paula, J.C. Bueno, L.B. Frugulhetti, I. Yoneshigue-Valentin, Y. *et* Teixeira, V.L. *Dictyota dolabellana* sp. nov. (Dictyotaceae, Phaeophyceae) based on morphological and chemical data. *Bot. Mar.* 50 (2007) 288-293.
- [17] Cavalcanti, D.N. Rezende, C.M. Pinto, A.C. *et* Teixeira, V.L. Diterpenoid Constituents from the Brown Alga *Dictyota menstrualis* (Dictyotaceae, Phaeophyta). *Nat. Prod. Commun.* 1(8) (2006) 609-611.
- [18] Spalding, M.D. Fox, H.E. Allen, G.R. Davidson, N. Ferdaña, Z.A. Finlayson, M. Halpern, B.S. Jorge, M.A. Lombana, A. Lourie, S.A. Martin, K.D. McManus, E. Molnar, J. Recchia, C.A. *et* Robertson, J. Marine ecoregions of the world: a bioregionalization of coastal and shelf areas. *Bioscience* 57 (2007) 573-583.
- [19] Yoneshigue, Y. Taxonomie et Ecologie des algues Marines dans la Région de Cabo Frio (Etat de Rio de Janeiro, Brésil). Tese de Doutorado. Faculdade de Sciences de Luminy. Universidade d'Aix Marseille II. (1985) 466 p
- [20] Guimarães, M.A. *et* Coutinho, R. Spatial and temporal variation of benthic marine algae at the Cabo Frio upwelling region, Rio de Janeiro, Brazil. *Aquat. Bot.* 52 (1996) 283-299.
- [21] De Clerck, O. Vos, P. De Gillis, M. *et* Coppejans, E. Molecular systematics in the genus *Dictyota* (Dictyotales, Phaeophyta): a first attempt based on restriction patterns of the Internal Transcribed Spacer 1 of the rDNA (ARDRA-ITS1). *Syst. Geogr. Pl.* 71 (2001). 25-35.
- [22] Tronholm, A. Steen, F. Tyberghein, L. Leliaert, F. Verbruggen, H. Siguan, M.A.R. *et* De Clerck, O. Species Delimitation, Taxonomy, and Biogeography of *Dictyota* in Europe (Dictyotales, Phaeophyceae). *J. Phycol.* 46(6) (2010) 1301-1321.

- [23] Tamura, K. Stecher, G. Peterson, D. Filipski *et* A. Kumar, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30 (2013) 2725-2729
- [24] Oliveira, A.S. Cavalcanti, D.N. Bianco, E.M. De Paula, J.C. Pereira, R.C. Yoneshigue-Valentin, Y. *et* Teixeira, V.L. Chemical composition of diterpenes from the brown alga *Canistrocarpus cervicornis* (Dictyotaceae, Phaeophyceae). *Nat. Prod. Commun.* 3(9) (2008) 1469-1472.
- [25] Sun, H.H. McConnell, O.J. Fenical, W. Hirotsu, K.. *et* Clardy J. Tricyclic diterpenoids of the dolastane ring system from the marine alga *Dictyota divaricata*. *Tetrahedron*, v. 37 (1981) 1237-1242.
- [26] González, A.G. Martín, J.D. Norte, M. Rivera, P. Perales, A. *et* Fayos, J.F. Structure and absolute configurations of *Dictyota* sp. diterpenes. *Tetrahedron*, v. 39 (1983) 3355-3357.
- [27] Joliffe, I. T. *Principal Component Analysis*, Springer, New York, USA, 1986.
- [28] Mas, S. Juanb, A. Taulera, R. Olivieri, O.C. *et* Escandaro, G.M. Review Application of chemometric methods to environmental analysis of organic pollutants. *Talanta* 80 (2010) 1052–1067.
- [29] Graves, R. Wang, D. Michael, C.H. "Ecotone." In: *Encyclopedia of Earth*. Eds. Cutler J. Cleveland (Washington, D.C.: Environ. Inf. Coalit., Natl. Counc. Sci. Environ. Encycl. Earth (2010) p24.
- [30] Kark, S. *et* Van Rensburg, B.J. Ecotones: Marginal or central areas of transition? *Isr. J. Ecol. Evo.* 52 (2006) 29-53.
- [31] Sudatti, D.B. Fujii, M.T. Rodrigues, S.V Turra, A. *et* Pereira, R.C. Effects of abiotic factors on growth and chemical defenses in cultivated clones of *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiales, Rhodophyta). *Mar. Biol.* 158 (2011) 1439-1446

- [32] Castelão, R.M. Campos, E.J.D. *et* Miller, J.L. A modeling study of coastal upwelling driven by Wind and meanders of the Brazil Current. *J. Coast. Res.* V.20 (2004) 662-671
- [33] Joshi, G.V. Gowda, C.A. Seasonal variations in chemical composition of *Sargassum ilicifolium* Grun. and sea water. *Indian J. Mar. Sci.* 4 (1975) 165–168.
- [34] Hay, M.E. Marine chemical ecology: Chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Ann Rev Mar Sci* 1 (2012) 193–212
- [35] Rhoades, D.F. Evolution of plant chemical defense against herbivores. In: Rosenthal, G. A. *et* Janzen, D.H. (eds.). *Herbivores: their interactions with secondary plant metabolites.* Academic Press, New York. (1979) pp 3-54.
- [36] Cronin, G. Resource allocation in seaweeds and marine invertebrates: Chemical defense patterns in relation to defense theories. In: McClintock JB, Baker BJ (eds.). *Mar. Chem. Ecol.* CRC Press (2001) pp 325-353.
- [37] Hay M.E. *et* Steinberg P.D. The chemical ecology of plantherbivore interactions in marine versus terrestrial communities. In: *Herbivores: their interaction with secondary plant metabolites.* Vol. II. Evolutionary and ecological processes. (Ed. by J. Rosenthal *et* M. Berenbaum), Academic Press, New York. (1992) pp. 371–413.
- [38] Van den Hoek, C. Mann, D.G. *et* Jahns. H.M. *Algae: an introduction to phycology.* Cambridge University Press, Cambridge. (1995) pp. 623.
- [39] De Clerck O. The genus *Dictyota* in the Indian Ocean. *Opera Bot. Belgica.* 13 (2003) 205.
- [40] Ateweberhan, M. Bruggemann, J.H. *et* Breeman, A.M. Seasonal patterns of biomass, growth and reproduction in *Dictyota cervicornis* and *Stoechospermum*

polypodioides (Dictyotales, Phaeophyta) on a shallow reef flat in the southern Red Sea (Eritrea). *Bot. Mar.*48 (2005) 8–17.

[41] Gaillard, J. Quelques remarques sur le cycle reproducteur des Dictyotales et sur ses variations. *Bull. Soc. Bot. Fr. Mém.* (1972) 145–150.

Dados suplementares:

Tabela S1: Quadro comparativo dos padrões de fragmentação dos produtos encontrados em *Canistrocarpus cervicornis* através da análise de CG/EM.

Produto	*RT	Padrão de fragmentação (principais picos)	Padrão (Oliveira <i>et al.</i> 2008)	Fórmula molecular
1	23,058	243, 162, 135, 121, 107,93, 79,55, 44 (pico base).		
2	27,521	286, 271, 268, 253, 243, 230, 225, 197, 183, 169, 157, 149,133, 121, 119,109, 107, 105, 95, 93, 91 , 81, 79, 69, 55, 44, 43(pico base).	286, 271, 268, 261, 253, 243, 230, 225, 149, 133, 121, 119, 109, 107, 105, 95, 93, 81, 69, 55, 43 (pico base)	C ₂₂ H ₃₂ O ₂
3	27,799	300, 232, 147, 136 (pico base), 133, 121, 119, 107, 105, 94, 93, 91, 79, 44, 43,41.		
4	27,968	288, 284, 241, 201, 199, 185, 173, 165, 161, 157, 149, 147, 145, 136, 133, 131, 129, 121, 119, 117, 95, 91, 79, 55, 44 (pico base), 43.		
5	28,201	286, 271, 243, 225, 175, 159, 151, 149 (pico base), 148, 135, 123, 121, 119, 109, 107, 105, 95, 93, 91, 81, 79, 77, 69, 55, 44.		
6	28,766	284, 241, 148, 133, 121, 119, 115, 105, 91, 44(pico base).		
7	29,315	344, 326, 266, 251, 242, 223, 209, 157, 133, 121, 119, 105, 91, 79, 55, 43 (pico base).	344, 326, 266, 251, 242, 223, 209, 157, 133, 121, 119, 105, 91, 79, 55, 43 (pico base).	C ₂₂ H ₃₂ O ₃
8	32,879	251, 219, 193, 157, 145, 133, 91, 55, 44(pico base)		
9	33,356	345, 344, 326, 301, 288, 266, 241, 223, 199, 185, 159, 149, 133, 121, 119, 107, 105, 91, 79, 43 (pico base)	362, 344, 326, 301, 288, 266, 241, 223, 199, 185, 159, 149, 121, 107, 105, 91, 79, 43(pico base)	C ₂₄ H ₃₄ O ₆
10	33,559	284, 241, 149,133, 121, 91, 77, 44 (pico base)		
11	34,158	344, 326, 319, 301, 266, 251, 242, 241, 223, 217, 209, 199, 157, 149, 133, 121, 119, 105, 91, 79, 55, 43 (pico base)	344, 326, 266, 251, 242, 223, 209, 157, 133, 121, 119, 105, 91, 79, 55, 43 (pico base)	C ₂₂ H ₃₂ O ₃
12	34,437	284, 241, 159, 149, 133, 121, 119, 105, 91, 44(pico base)		
13	35,108	319,301, 241, 199, 157, 119, 105, 91, 79, 44, 43(pico base)		

* RT = tempo de retenção dos produtos, em minutos.

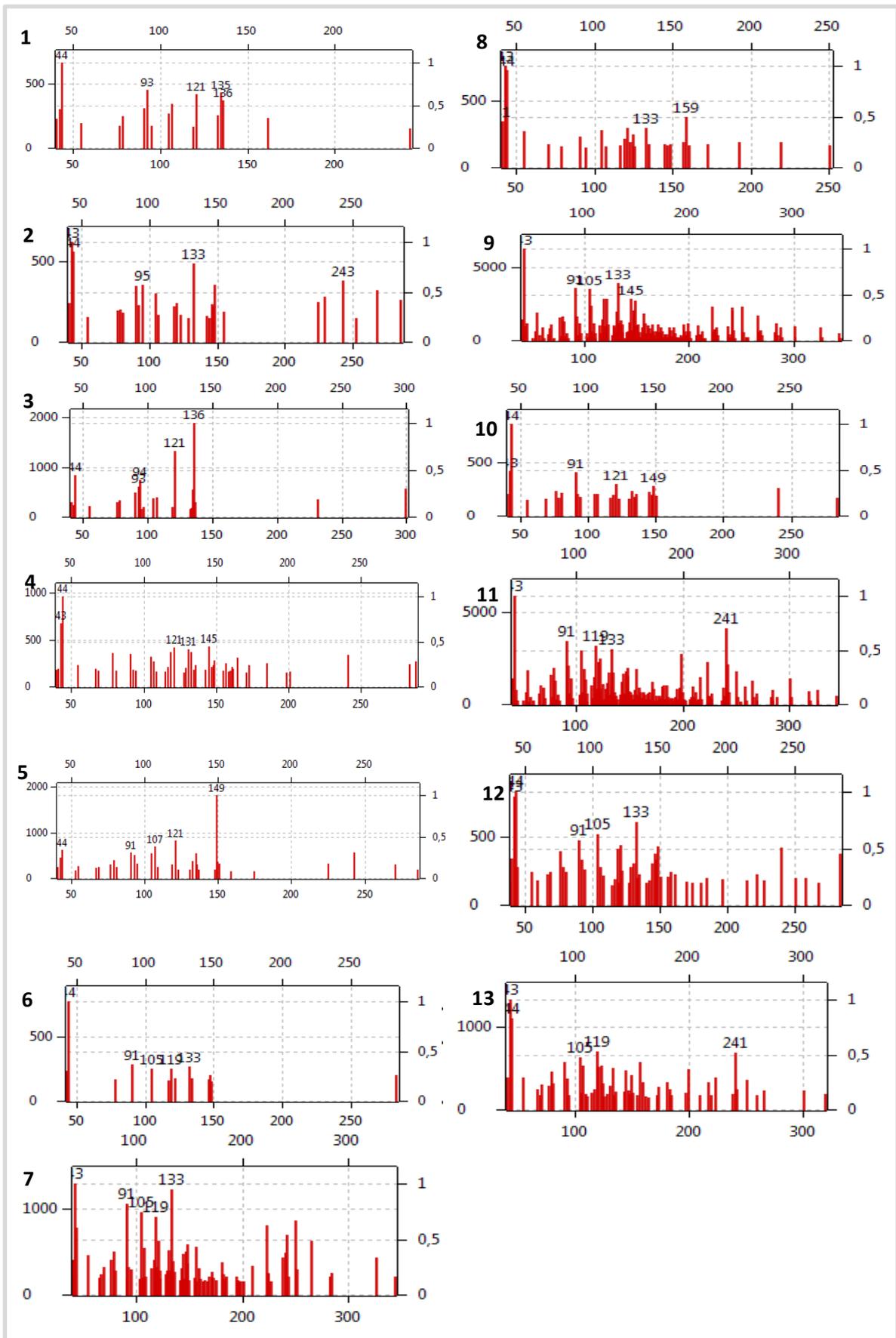


Figura S1: Gráficos com espectros de massa (13 produtos de *Canistrocarpus cervicornis*).

Tabela S1:Dados abióticos dos locais de coleta de *Canistrocarpus cervicornis*.

Dados abióticos					
Local de coleta	Data	Maré	Sal ^a	TSA ^b	PC ^c
Praia da Penha, Itaparica, Salvador, Bahia	13/07/2012	1.8	34,2	27,7°C	2 - 3m
Praia do Muro alto, Ipojuca, Pernambuco.	24/07/2012	0.5	35,4	28,9°C	1 – 2m
Prainha, Arraial do Cabo, Rio de Janeiro	01/07/2012	1.0	36	24.1°C	1 – 2m
A	Temperatura da superfície da água				
B	Profundidade de coleta				
C	Salinidade				

Tabela S2: Análise de variância feita com os majoritários de *Canistrocarpus cervicornis*.

One Way Analysis of Variance Dependent Variable: 33,3560

Normality Test: Passed (P = 0,059)

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
RJ	13	0	3122737,243	2953776,060	3411444,646
Ba	12	0	3258791,560	852554,790	4505269,689
Pe	12	0	8243210,232	7414525,552	8627147,702

H = 23,718 with 2 degrees of freedom. (P = <0,001)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	Q	P<0,05
Pe vs RJ	18,885	4,358	Yes
Pe vs Ba	18,083	4,092	Yes
Ba vs RJ	0,801	0,185	No

One Way Analysis of Variance Dependent Variable: 29,3150

Normality Test: Passed (P = 0,276)

Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Group	N	Missing	Median	25%	75%
RJ	13	2	804379,511	416627,345	1088730,109
Ba	12	1	288329,858	82885,648	565058,778
Pe	12	0	2343961,514	1371312,525	2980864,021

H = 23,735 with 2 degrees of freedom. (P = <0,001)

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Dunn's Method) :

Comparison	Diff of Ranks	Q	P<0,05
Pe vs Ba	19,902	4,788	Yes
Pe vs RJ	12,811	3,082	Yes
RJ vs Ba	7,091	1,670	No

Tabela S3: Localidade de coleta e números de acesso GenBank das sequências utilizadas no presente estudo.

Espécie	Localidade de coleta	Código GenBank	
		nad1	rbcL
<i>Padina Pavonica</i> (Linnaeus) Thivy	Provence, France	EU681498	EU579961
<i>Dictyota dichotoma</i> (Hudson) Lamouroux	Helgoland, Escócia		DQ472051
<i>Dictyota pinnatifida</i> Kützing	Ilhas Canárias, Espanha	GQ425171	GQ425115
<i>Dictyota mertensii</i> (Martius) Kützing	Punta Cana, República Dominicana	GQ425180	GQ425114
<i>Dictyota bartayresiana</i> J. V. Lamouroux	Punta Cana, República Dominicana	GQ425183	GQ425107
<i>Dictyota adnata</i> Zanardini	Raja Ampat, Indonesia	GQ425178	GQ425106
<i>Canistrocarpus crispatus</i> (Lamouroux) De Paula et De Clerck	Ilhas Canárias, Espanha	GQ425176	GQ425119
<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Kützing) De Paula et De Clerck	Ilhas Canárias, Espanha	GQ425184	
<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Kützing) De Paula et De Clerck	Zanzibar, Tanzania		AJ287851
<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Kützing) De Paula et De Clerck	Maribago, Ilha Mactan, Filipinas		DQ472049
<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Kützing) De Paula et De Clerck	Ilha Panglao, Filipinas		DQ472047
<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Kützing) De Paula et De Clerck	Apale, Isabel, Filipinas		DQ 472073
<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Kützing) De Paula et De Clerck	Arraial do cabo, Rio de Janeiro, Brasil		
<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Kützing) De Paula et De Clerck	Salvador, Bahia, Brasil		
<i>Canistrocarpus cervicornis</i> (Kützing) De Paula et De Clerck	Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil		
<i>Rugulopteryx okamurae</i> (E. Y. Dawson)	Laguna de Thau, França	GQ425185	AB096888