

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA  
Maria Gabriela Azevedo Barros

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DA ALGA PARDA *Dictyota mertensii*  
DE ILHAS OCEÂNICAS BRASILEIRAS**

Florianópolis, SC.  
2018



Maria Gabriela Azevedo Barros

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DA ALGA PARDA *Dictyota mertensii*  
DE ILHAS OCEÂNICAS BRASILEIRAS**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-graduação em Farmácia da  
Universidade Federal de Santa Catarina  
para a obtenção do Grau de mestre em  
Farmácia  
Orientadora: Profa. Dra. Miriam de  
Barcellos Falkenberg

Florianópolis  
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barros, Maria Gabriela Azevedo  
INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DA ALGA PARDA *Dictyota*  
*mertensii* DE ILHAS OCEÂNICAS BRASILEIRAS / Maria  
Gabriela Azevedo Barros ; orientador, Miriam de  
Barcellos Falkenberg, 2018.  
110 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,  
2018.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Dictyota mertensii*. 3. Ilhas  
Oceânicas. 4. Diacetal. 5. *Pachidictyol* A. I.  
Falkenberg, Miriam de Barcellos . II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Farmácia. III. Título.

Maria Gabriela Azevedo Barros

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DA ALGA PARDA *Dictyota mertensii*  
DE ILHAS OCEÂNICAS BRASILEIRAS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de  
“Mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-  
Graduação em Farmácia

Florianópolis, 21 de março de 2018.

---

Prof.<sup>a</sup> Tânia Beatriz C. Pasa, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Miriam de Barcellos Falkenberg, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Elenara Lemos Senna, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof.<sup>a</sup> Dulce Helena Siqueira Silva, Dr.<sup>a</sup>  
Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho – UNESP- Araraquara



Dedico este trabalho a Deus e minha família.





## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus, por esta oportunidade que Ele me deu, e por todas as pessoas que colocou em meu caminho.

Aos meus pais Luciana e Paulo Barros, a minha irmã Maria Camila A. Barros, aos meus irmãos Bruno Barros, Paulo Barros Jr., ao Bruno Gris, aos meus avôs, Margarida e José Antonio Azevedo, Luiza e Nelson Barros, a Melissa Moliterno, por todo apoio e paciência, por todas as vezes que me consolaram e me incentivaram. Amo vocês!

Agradeço também à minha orientadora, a Professora Miriam de Barcellos Falkenberg, por ter aceitado me orientar de braços tão abertos, e por todos os ensinamentos durante o trabalho.

Agradeço às Professoras Elenara Lemos Senna e Dulce H. Siqueira Silva, pela atenção na avaliação do trabalho e pelas considerações enriquecedoras.

A Ana Cláudia, Gabriele, Satomy, Tauana, Carolina, Lucas e Vinícius, Fernanda e Cintia e a todos os membros do laboratório Central Analítica pela companhia durante o desenvolvimento do trabalho, e também pelas incontáveis ajudas e dicas.

A todos os meus amigos que durante a minha vida em Floripa me ajudaram a chegar aqui, a Lais Magalhães e ao João Pereira que me receberam e cuidaram de mim, Hecete e ao Renato Menezes que foram companhias tão divertidas e em momentos tão difíceis. Às minhas amigas Carolini Rossa, Giselle Cordeiro, Jade Garcia, Laura Leite, Leticia Pisetta e a Tatiana Cassias que ajudaram a tornar os desafios mais leves. E a todos os outros que não foram aqui citados, o meu muito obrigada.

Agradeço à equipe do Projeto ProspecMar-Ilhas, aprovado pelo CNPq, pela coleta das algas que foram objeto deste trabalho.



Tu te tornas eternamente responsável por aquilo  
que cativas.  
(Antonie de Saint-Exupéry, 1943)



## RESUMO

Nas últimas décadas, aumentou o número de medicamentos tendo como protótipo metabólitos marinhos, como vidarabina, citarabina e halicondrina B. Estudos recentes com extratos de *Dictyota* spp. coletadas na costa brasileira relataram atividade *antifouling*, citotóxica, antifúngica e antibacteriana, anti-HIV e anti-Herpes simplex tipo 1. No âmbito de uma dissertação do PGFAR/UFSC, investigou-se o extrato da alga parda *Dictyota mertensii* (estágio adulto) da Ilha da Trindade (ES), sendo isolados diterpenos com atividades citotóxica e antimicrobiana. Neste sentido, foi proposto o estudo de materiais da mesma espécie coletados em outro local e/ou em outra fase do ciclo vegetativo, considerando que diferenças ambientais e fisiológicas podem influenciar a composição química dos organismos. Deste modo, os extratos diclorometano/metanol da alga parda *Dictyota mertensii* obtida de duas coletas diferentes coletada em estágio jovem, na Ilha da Trindade, e em estágio adulto, no arquipélago de Fernando de Noronha foram submetidos a avaliações de atividade citotóxica e a sucessivos procedimentos cromatográficos. As frações obtidas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio. Tais processos permitiram o isolamento de um diterpeno do tipo xeniano contendo grupo diacetil inédito para a espécie e de um guaiano- prenilado conhecido como pachidictyol A. Vários outros compostos sofreram degradação durante o fracionamento, inclusive um dialdeído isolado da alga de Fernando de Noronha que degradou durante a obtenção dos espectros. O diacetil (MDM-1) mostrou excelente atividade contra as linhagens para câncer cólon (HCT-116), atividades moderadas contra a linhagem de células de melanoma metastático murino B16-F10 e células de rim embrionário 293A. O pachidictyol A apresentou excelente atividade contra HCT-116 e 293A, e moderada citotoxicidade para as linhagens B16-F10 e para a de câncer de próstata metastático humano PC3-M.

**Palavras-chave:** *Dictyota mertensii*. Ilhas oceânicas. pachidictyol A. diacetil.



## ABSTRACT

In recent decades, there has been an increase in the number of new drugs that had marine metabolites as prototypes, examples of which are vidarabine, cytarabine, and halichondrin B. Studies reported that extracts from *Dictyota* spp. collected on the Brazilian coast showed antifouling, cytotoxic, antifungal, antibacterial, anti-HIV, and anti-herpes simplex type 1 activities. A previous PGFAR-UFSC dissertation study isolated diterpenes with cytotoxic and antimicrobial activities from extracts of the brown macroalga *Dictyota mertensii*, collected at the mature stage in Ilha de Trindade, ES, Brazil. Considering that environmental and physiological differences may influence the chemical composition of organisms, this study aimed to investigate *D. mertensii* extracts obtained from specimens collected at different sites and/or in different periods of the vegetative phase. Thus, dichloromethane/methanol extracts of juvenile *D. mertensii* plants collected in Ilha de Trindade in August of 2014 and mature plants collected in the Fernando de Noronha Archipelago in October 2016 were submitted to successive chromatographic separations. Each fraction was monitored by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and evaluated for cytotoxic activity. These processes allowed the isolation of a xeniane diterpene, previously reported as diacetal *b*, and the prenylated guaianic pachydictyol A, being the former an unpublished metabolite for this species and the latter a metabolite already reported for this species. In addition, a dialdehyde was isolated from the algae collected in Fernando de Noronha; however, its identification was not possible because of compound degradation during NMR analysis. Diacetal *b* presented high cytotoxicity against colon cancer cells (HCT-116) and moderate activity against metastatic murine melanoma cells (B16-F10) and embryonic kidney cells (293A). Pachydictyol A showed high cytotoxicity against HCT-116 and 293A cells and moderate activity against B16-F10 and metastatic human prostate cancer cells (PC3-M).

**Keywords:** *Dictyota mertensii*. Oceanic Island. Pachydictyol A. Diacetal.





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas de compostos isolados de organismos marinhos brasileiros. ....	33
Figura 2 - Formação dos compostos do Grupo químico <i>Dictyota</i> . ....	36
Figura 3 - Estrutura do composto (6 <i>R</i> )-6-acetoxidichotoma-3,14-dieno-1,17-dial ....	37
Figura 4- Aspecto geral dos talos da alga <i>Dictyota mertensii</i> . ...	38
Figura 5- Estruturas de alguns metabólitos isolados da alga <i>D. mertensii</i> . ....	39
Figura 6 - Local de coleta das amostras de <i>D. mertensii</i> utilizadas neste trabalho. ....	41
Figura 7- Fluxograma dos procedimentos cromatográficos para o extrato bruto DMJT (parte A) ....	45
Figura 8 - Fluxograma dos procedimentos cromatográficos para o extrato bruto DMJT (parte B).....	46
Figura 9 - Fluxograma dos procedimentos cromatográficos para o extrato bruto DMFN.....	50
Figura 10 - Reação de redução do sal de MTT em Formazana. .	54
Figura 11- Espectros de RMN de hidrogênio comparativo dos extratos brutos MDFMN-M (em verde), MDMFN (em vermelho) e DMJT (em azul). ....	57
Figura 12- Espectro de RMN de hidrogênio do composto MDM-1 (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	60
Figura 13- Espectro de carbono 13 do composto MDM-1 (75 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	61
Figura 14 - Espectro de 13C RMN do tipo DEPT do composto MDM-1. ....	62
Figura 15 - Estrutura parcial de diacetal, proposta a partir das correlações visualizadas no experimento HMBC de MDM-1.....	63
Figura 16 - Mapa de correlação HSQC para o composto MDM-1 (em vermelho CH/CH <sub>3</sub> e em azul, CH <sub>2</sub> ).....	64
Figura 17 - Mapa de correlação do tipo HMBC do composto MDM-1. ....	65
Figura 18 - Estrutura parcial do diacetal, com anel furano, deduzida a partir das correlações observadas no experimento de HMBC para MDM-1. ....	66
Figura 19 - Terceira estrutura parcial proposta para MDM-1 baseada no HMBC. ....	67

Figura 20 - Estrutura da melhor hipótese encontrada na literatura (Ishitsuka et al., 1982) e considerada compatível com MDM-1. ....	67
Figura 21 – Estrutura do diterpeno xeniano MDM-1 com destaque para seus centros quirais, e nome químico da estrutura. ....	69
Figura 22 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto MFN-3 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	74
Figura 23- Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do composto MFN-3 (75 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	75
Figura 24- Mapa de correlação do tipo HSQC para MFN-3 (em azul $\text{CH}/\text{CH}_3$ e em vermelho $\text{CH}_2$ ). ....	76
Figura 25 - Mapa de correlação do tipo HMBC para MFN-3. ....	77
Figura 26 - Mapa de correlação do tipo COSY para MFN-3. ....	78
Figura 27- Primeira estrutura parcial do composto MFN-3, com representação das correlações do HMBC. ....	79
Figura 28- Primeira estrutura parcial do composto MFN-3, destacando as correlações observadas no COSY. ....	79
Figura 29 - Segunda estrutura parcial do composto MFN-3, destacando as correlações observadas no mapa de correlação HMBC. ....	80
Figura 30 - Segunda estrutura parcial do composto MFN-3, destacando as correlações observadas no mapa de correlação COSY. ....	81
Figura 31 – Estrutura final proposta para o composto MFN-3, a partir do conjunto de dados de RMN. ....	81
Figura 32- Aspecto geral do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto MFN-11 (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	86
Figura 33 - Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto MFN-11, com marcação dos deslocamentos químicos na região acima de 6 ppm (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	87
Figura 34- Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto MFN-11, com marcação dos deslocamentos na região abaixo de 5 ppm (300 MHz, $\text{CDCl}_3$ ). ....	88
Figura 35 - Espectros de $^1\text{H}$ RMN do composto MFN-11 antes (azul) e após (vermelho) a degradação da amostra. As setas destacam as regiões do espectro em que as alterações são mais evidentes. ....	90

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Resultados da atividade citotóxica de extratos, frações e compostos obtidos nesta dissertação, frente a células de adenocarcinoma colorretal humano HCT-116. ....	92
Gráfico 2 - Concentração inibitória média (CI <sub>50</sub> ) para diferentes linhagens celulares das amostras que foram ativas contra a linhagem HCT-116. Valores expressos em µg/mL. ....	94



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Esquema de solventes utilizados para CLV-DMJT....	47
Tabela 2 - Esquema de solventes utilizados para CCA. ....	48
Tabela 3 - Purificação por CLAE das frações de CCA. ....	48
Tabela 4 - Esquema de solventes utilizados na CLV – DMFN. .	51
Tabela 5- Esquema de solventes para a FSN-1. ....	52
Tabela 6- Esquema de solventes para a FSN-4. ....	52
Tabela 7 - Esquema de solventes para FSN-5. ....	53
Tabela 8 - Valores de deslocamentos químicos relatados na literatura para o composto com a estrutura proposta para MDM-1.....	68
Tabela 9 - Rendimentos das frações da CLAE FSN-1. ....	71
Tabela 10 - Valores de deslocamentos químicos de carbonos do composto MFN-3 e suas correlações com hidrogênios a partir do experimento HSQC. ....	73
Tabela 11 - Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de hidrogênio obtidos para MNF-3 e os relatados na literatura para o pachidictyol A isolado originalmente.....	83
Tabela 12 - Rendimentos das frações puras obtidas da CLAE das frações FSN-4.3 e FSN-5.3. ....	84
Tabela 13 - Valores de deslocamentos químicos de <sup>1</sup> H RMN para o composto MFN-11. ....	85
Tabela 14 - Comparação entre os deslocamentos químicos dos <sup>1</sup> H aldeídicos já descritos na literatura para o gênero e para MFN-11. ....	89
Tabela 15- Concentrações inibitórias médias (CI <sub>50</sub> ) de amostras testadas no âmbito do presente trabalho para citotoxicidade frente a HCT-116.....	91
Tabela 16 - Resultados de inibição da proliferação celular para diferentes linhagens celulares (HCT-116; B16-F10; PC3-M; 293A)....	94



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\int$	Integração de hidrogênio em RMN
293A	Célula de rim embrionário
$\delta_C$	Deslocamento químico em ppm no espectro de $^{13}\text{C}$ RMN
$\delta_H$	Deslocamento químico em ppm no espectro de $^1\text{H}$ RMN
AcEOt	Acetato de etila
Ara-A	vidarabina
Ara- C	citarabina
B16-F10	Melanoma metastático murino
$^{13}\text{C}$	Ressonância magnética nuclear de Carbono 13
CC	Coluna clássica
CCD	Cromatografia em camada delgada
$\text{CI}_{50}$	Concentração inibitória média
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
$\text{CDCl}_3-d$	Clorofórmio deuterado
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Diclorometano
cHex	Ciclohexano
COSY	Espectro de correlação ( <i>Correlated spectroscopy</i> )
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
Dox	Doxorrubicina
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplo duplete
DMJT	<i>Dictyota metensii</i> jovem da Trindade
DMFN	<i>Dictyota mertensii</i> de Fernando de Noronha
FSN	Extração em fase sólida de Fernando de Noronha
$^1\text{H}$ RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio

HCT-116	Carcinoma de cólon humano
Hex	Hexano
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPLC	High performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)
HMBC	Correlação heteronuclear através de múltiplas ligações ( <i>Heteronuclear multiple bond correlation</i> )
HSQC	Correlação heteronuclear de quantum-simples ( <i>Heteronuclear single quantum correlation</i> )
IC95%	Intervalo de Confiança 95 %
INCA	Instituto Nacional do Câncer (Brasil)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
Mult.	Multiplicidade
MCCA	Coluna Clássica A
MeOH	Metanol
n.a.	Não atribuído
NCI	National Cancer Institute (Estados Unidos)
PC3-M	Câncer de próstata metastático humano
PN	Produtos naturais
PNM	Produtos naturais Marinhos
Rf	Fator de retenção ( <i>Retardation factor</i> )
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Sp	coluna do tipo Sephadex
<i>s</i>	Simpleto
<i>sl</i>	Simpleto largo
<i>t</i>	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
UFC	Universidade Federal do Ceará



UV

Ultra- violeta







## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
1.1	OBJETIVOS .....	29
<b>1.1.1</b>	<b>Objetivo geral .....</b>	<b>29</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>29</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>31</b>
2.1	METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS E OS PRODUTOS NATURAIS.....	31
2.2	PRODUTOS NATURAIS MARINHOS .....	32
2.3	Algas .....	34
<b>2.3.1</b>	<b>Ordem Dictyotales e família Dictyotaceae .....</b>	<b>35</b>
2.3.1.1	Espécie <i>Dictyota mertensii</i> (C. Martius) Kützing .....	37
2.4	ATIVIDADE CITOTÓXICA .....	40
<b>3</b>	<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>41</b>
3.1	MATERIAIS .....	41
<b>3.1.1</b>	<b>Material Biológico.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1.2</b>	<b>Solventes, reagentes e adsorventes.....</b>	<b>42</b>
<b>3.1.3</b>	<b>Equipamentos .....</b>	<b>42</b>
3.2	MÉTODOS .....	43
<b>3.2.1</b>	<b>Extração .....</b>	<b>43</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Fracionamento cromatográfico visando o isolamento de compostos do extrato DMJT .....</b>	<b>43</b>
3.2.2.1	Cromatografia líquida a vácuo (CLV) do extrato bruto DMJT 47 47	
3.2.2.2	Coluna aberta CCA .....	47 48
3.2.2.3	Purificação por CLAE de frações de CCA.....	48
<b>3.2.3</b>	<b>Fracionamento cromatográfico visando o isolamento de compostos do extrato DMNF .....</b>	<b>49</b>

3.2.3.1	Cromatografia líquida a vácuo do extrato bruto DMFN.....	51
3.2.3.2	Extração em fase sólida da fração DMNF-2 (FSN-1).....	51
3.2.3.3	Coluna em Sephadex da fração DMFN-12 (SP-12).....	52
3.2.3.4	Extração em fase sólida da fração DMFN-11 (FSN-4).....	52
3.2.3.5	Extração em fase sólida da fração SP-12 (FSN-5).....	52
3.2.3.6	CLAE da fração FSN-1.2/3.....	53
3.2.3.7	CLAE da fração FSN-4.3.....	53
3.2.3.8	CLAE da fração FSN-5.3.....	53
<b>3.2.4</b>	<b>Identificação e elucidação estrutural dos compostos isolados</b>	<b>54</b>
<b>3.2.5</b>	<b>Atividade biológica – ensaio de citotoxicidade .....</b>	<b>54</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
4.1	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS .....	56
4.2	FRACIONAMENTO DO EXTRATO DMJT .....	58
<b>4.2.1</b>	<b>CLV-DMJT .....</b>	<b>58</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Coluna CCA .....</b>	<b>59</b>
4.2.2.1	Identificação estrutural do composto MDM-1 .....	59
4.3	FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DMFN	70
<b>4.3.1</b>	<b>CLV-DMFN.....</b>	<b>70</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Extração em fase sólida da fração DMFN-2 (FSN-1) .....</b>	<b>70</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Coluna sephadex da fração DMFN-12 (SP-12) .....</b>	<b>70</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Extração em fase sólida da fração DMFN-11 (FSN-4) ....</b>	<b>70</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Extração em fase sólida da fração DMFN-12 (FSN-5) ....</b>	<b>71</b>
<b>4.3.6</b>	<b>CLAE da fração FSN-1.2 .....</b>	<b>71</b>
4.3.6.1	Identificação estrutural do composto MFN-3 .....	72
<b>4.3.7</b>	<b>CLAE das frações FSN 4.3 e 5.3 .....</b>	<b>83</b>
4.3.7.1	Identificação estrutural do composto MFN-11 .....	84
4.4	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	91
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>95</b>

<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>99</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>101</b>





## INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais (PN) como tratamento de diferentes patologias é milenar e vem acompanhando a evolução da humanidade. Os primeiros registros são de 2600 a.C, na antiga Mesopotâmia, onde em uma tábua de argila foram encontrados registros de plantas e suas finalidades terapêuticas. Aproximadamente mil anos depois, no Egito, teriam sido registradas no papiro de Ebers mais de 700 receitas com base em PN e seu emprego medicinal (DIAS, URBAN e ROESSNER, 2012; CRAGG e NEWMAN, 2013).

O conhecimento e a cultura popular a respeito de PN são muito importantes para a identificação de famílias que possam ter determinada atividade biológica, servindo de base para estudos fitoquímicos na busca de novos fármacos. Contudo, para produtos naturais marinhos (PNM) o conhecimento popular não é tão grande, sendo encontrados poucos registros (CRAGG; NEWMAN, 2013). Entretanto há dados que mostram o uso de algas na China em 500 a.C., como por exemplo, o uso do suco da alga vermelha *P. umbilicallis* no tratamento de patologias (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012).

O Brasil, devido a sua longa extensão territorial e com a maior floresta tropical do mundo, tem diversas contribuições para o desenvolvimento de fármacos a partir de PN, como o inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), captopril, isolado do veneno da cobra jararaca (*Bothrops jararaca*) na década 1960, e o lapachol, importante antineoplásico oriundo da casca de árvores amazônicas do gênero *Tabebuia*, sendo inicialmente isolado do ipê roxo (*Tabebuia avellanedae* Lor) (ARAÚJO; ALENCAR; NETO, 2002; NEWMAN, 2017).

A vasta extensão dos oceanos os torna um ambiente cheio de diversidade e adversidade, onde para sobreviver, as espécies que ali habitam precisam desenvolver eficientes mecanismos de comunicação e defesa contra predadores. Os compostos produzidos por organismos marinhos estão muitas vezes relacionados com o ambiente em que estes estão inseridos e apresentam uma complexidade estrutural que difere do que é produzido por organismos terrestres (STOUT; KUBANEK, 2010; STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

O estudo químico dos organismos marinhos começou na década de 1950 com a esponja caribenha *Tectitethya crypta*, realizado pelos pesquisadores Bergmann e Feeney (RANGEL e FALKENBERG, 2015) e atualmente se faz importante não só para a busca de novos candidatos a fármacos, mas também para o acompanhamento e monitoramento das

mudanças ocorridas no ambiente, em decorrência de fatores climáticos e da urbanização predatória (COSTELLO et al., 2001).

O Brasil possui 8.500 km de costa e conta com uma área marítima total de aproximadamente 4 milhões de km<sup>2</sup> (cerca de 350 milhas náuticas). Tal extensão abriga biomas diversos e muitas espécies diferentes, mostrando-se um rico ambiente para estudos e pesquisas (BRASIL, 2017a; BRASIL, 2017b). Os estudos com PNM iniciaram-se no país com um grupo de pesquisa na Universidade Federal Fluminense nos anos 1960 e atualmente há alguns grupos e redes integrando várias universidades, como a rede Sisbiota-Mar, que engloba as Universidades Federais de Santa Catarina e do Ceará, entre outras, além da Universidade de São Paulo, e o projeto ProspecMar-Ilhas (financiado pelo CNPq), ao qual o presente trabalho se vincula.

As principais classes estudadas de organismos marinhos são algas, invertebrados (esponjas, moluscos e ascídias), e micro-organismos. Quanto aos compostos químicos mais estudados, destacam-se os peptídeos, alcaloides indólicos, policetídeos, compostos halogenados e terpenos (MAYER et al., 2013; HU et al., 2015; BLUNT et al., 2017).

A espécie-alvo do presente projeto é a alga parda *Dictyota mertensii*, a qual teve sua investigação iniciada em nosso grupo há 3 anos, mostrando resultados interessantes relacionados a sua atividade biológica e composição química. O primeiro trabalho (PHILIPPUS, 2016), como extrato bruto coletado na ilha da Trindade / ES, avaliou a atividade antimicrobiana do extrato frente as cepas de *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC25923) e *C. albicans* (ATCC90112).

No trabalho de Philippus (2016) ainda foi observada a presença de metabólitos da classe dos diterpenos, sendo isolado um guaiano prenilado já reportado anteriormente para esta espécie, mas também um do tipo dolabelano, o que não seria esperado para esta espécie, com base em Teixeira (2013). Uma vez que o trabalho de Philippus foi o primeiro estudo fitoquímico realizado com a alga parda *D. mertensii* coletada na ilha da Trindade / ES, com o objetivo de avançar na investigação de possíveis diferenças na composição química em função do local de coleta, foi proposta a continuidade da investigação do perfil químico desta alga.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Realizar a investigação química e biológica de extratos da alga parda *Dictyota mertensii* (C. Martius) Kützting, coletada em ilhas oceânicas brasileiras.

### 1.1.2 Objetivos específicos

A) Obter extratos de *Dictyota mertensii* (C. Martius) Kützting a partir de coletas em diferentes ilhas oceânicas do litoral brasileiro e/ou estágios do ciclo vegetativo e submetê-los a avaliação preliminar de atividade biológica;

B) Isolar metabólitos secundários presentes nos extratos selecionados;

C) Elucidar estruturalmente ou identificar metabólitos isolados;

D) Submeter os compostos isolados à avaliação de citotoxicidade.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 METABÓLITOS PRIMÁRIOS E SECUNDÁRIOS E OS PRODUTOS NATURAIS

Os metabólitos produzidos por um organismo vivo, seja no ambiente terrestre ou marinho, são divididos em primários e secundários. Em geral são compostos pequenos, na faixa  $\leq 3000$  Da. A diferença entre os dois grupos nesta classificação está ligada a sua função na vida do organismo produtor, sendo que os primários têm função estrutural e energética, fundamental para o crescimento e desenvolvimento do organismo. Fazem parte dos metabólitos primários as proteínas, os carboidratos e os ácidos nucleicos (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; PATRA et al., 2013; MARTIM et al., 2014).

Já os metabólitos secundários não são essenciais para o organismo que o produz, mas são importantes para a promoção de uma adaptação ao meio, servem como mecanismo de defesa, entre outras funções. Sua produção está ligada as rotas biossintéticas de metabólitos primários, como o ciclo de Krebs. O esqueleto base dos metabólitos secundários é derivado de intermediários dessas rotas sintéticas, como por exemplo, terpenos que são derivados do ácido mevalônico. Contudo, o tipo de esqueleto produzido comumente está restrito ao grupo taxonômico ao qual o organismo produtor pertence (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012, MARTIM et al., 2014).

São considerados metabólitos secundários os terpenos, quinonas, alcaloides, flavonoides, entre outros, e não raras vezes são estes os responsáveis pela atividade biológica do organismo (PATRA et al., 2013; ANARAT-CAPPILLINO; SATTELY, 2014).

Cerca de 60 % dos fármacos desenvolvidos nas últimas décadas (período entre os anos de 1980-2010) foram a partir de PN, neste quadro são incluídos produtos de síntese que tiveram como protótipo um produto de origem natural, produtos resultantes da derivatização de PN, produtos de origem biológica, vacinas, além de PN propriamente ditos como o antimalárico artemisinina. Grande parcela deste percentual corresponde a produtos naturais derivatizados, representando 28 %. Pode-se ainda destacar as classes terapêuticas dos antiparasitários, onde 50% é um produto natural ou derivado; para os antibióticos, 57% são produtos de derivatização de PN (NEWMAN; CRAAG, 2012).

## 2.2 PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

As águas correspondem acerca de 70% da superfície terrestre, abrigando uma enorme biodiversidade, em seus diferentes biomas. Os PNM (produtos naturais marinhos) resultam da interação entre a espécie com seu ambiente, sendo a produção influenciada por fatores como: teor de luminosidade recebida pelos organismos, pH do meio, salinidade, além da presença de organismos associados (STENGEL; CONNAN; POPPER, 2011).

Desde que os estudos começaram, na década de 1950, ocorreram muitas descobertas, e hoje há fármacos disponíveis no mercado que tiveram como protótipo algum metabólito produzido por organismo marinho. Um exemplo é o antitumoral citarabina (Ara-C), derivado do nucleosídeo espongouridina (isolada da esponja *T. crypta*), que foi o primeiro a chegar ao mercado na década de 1970. Atualmente são sete os fármacos aprovados pelas agências de saúde internacionais, entre os quais tem-se os antitumorais brentuximabe vedotina (Adcetris®), trabectedina (Yondelis®) e halicondrina B (Halaven®), o analgésico ziconotídeo (Prialt®). Ainda em estudos clínicos, há diversos exemplos que apresentaram potencial para o tratamento da dor e do câncer (RANGEL; FALKENBERG, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2014; MALVE, 2016; BLUNT et al. 2017).

Um levantamento realizado por Montaser e Luesch (2011) mostrou que 71 % dos esqueletos estruturais provenientes de organismos marinhos são exclusivos destes, tal preposição mostra a diversidade química encontrada nos oceanos e as diferenças em relação aos possíveis metabólitos encontrados no ambiente terrestre.

Um comparativo realizado ainda na década de 1990, a partir de informações do banco de dados do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) mostrou que apesar do maior conhecimento de estruturas oriundas de organismos terrestres, quando comparado às conhecidas do ambiente marinho, estas últimas se mostraram mais tóxicas para as linhagens tumorais que as primeiras (MUNRO et al., 1999).

É notável quão promissores são os compostos provenientes de organismos marinhos. Contudo, o estudo de forma sistemática é recente e os avanços também. Como resultados desses fatos, cerca de metade das moléculas foram isoladas somente após os anos 2000 (COSTA-LOTUFO et al., 2009).

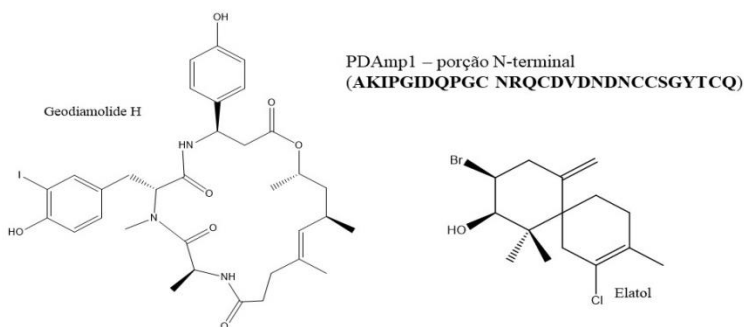
Com os estudos já realizados, é possível observar que as classes químicas mais importantes para PNM são advindas de rotas biossintéticas

clássicas, como a do ácido chiquímico e ácido mevalônico (MAYER et al., 2013).

Merece particular destaque, porém, a dificuldade de coleta, dependente de complexa logística e infraestrutura envolvendo embarcações, equipamentos de mergulho autônomo, ente outros, além de dificuldades de acesso a regiões perigosas devido à presença de rochedos, ventos, ondulação e animais marinhos que representem risco à atividade de mergulho. Tudo isto faz com que o ambiente marinho ainda seja um campo com muito a ser explorado (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Neste cenário, o Brasil se destaca com a presença de espécies endêmicas, como a esponja *Geodia corticostylifera* que produz o peptídeo geodiamolide H, sendo esse um potente antiproliferativo (RANGEL et al., 2006). O coral *Phyllogorgia dilatada*, conhecido como orelha-de-elefante, produz o peptídeo PDamp1, que é ativo contra diversas cepas de fungos e bactérias, inclusive cepas resistentes aos tratamentos tradicionais (ALVES DE LIMA et al., 2013). Destaca-se o sesquiterpeno elatol, isolado da alga vermelha *Laurencia dendroidea* por Lhullier e colaboradores (2009), e também de outras espécies de *Laurencia*; este composto mostrou-se muito ativo contra várias linhagens tumorais, inclusive linfomas de não-Hodgkin (CAMPOS et al., 2012; PETERS et al., 2017) e também contra *Leishmania* (DOS SANTOS et al., 2010), além de apresentar atividade antimicrobiana (VAIRAPPAN et al., 2001; 2003) (Figura 1).

Figura 1 - Estruturas de compostos isolados de organismos marinhos brasileiros.



Fonte: Autor.

## 2.3 Algas

As algas são organismos que habitam a Terra há milhões de anos, sendo utilizadas pelas civilizações humanas desde pelo menos 500 a.C. como fonte de alimento e para o tratamento de algumas patologias (LIU et al., 2012; BEETUL et al., 2016). No entanto, a denominação algas é muito genérica, sendo então estas divididas em dois grandes grupos, as microalgas e as macroalgas. Ao todo, acredita-se que há cerca de 33 mil espécies (BEETUL et al., 2016; GUIRY, 2012).

Consideradas muito importantes para os ecossistemas marinhos, as algas compõem a base da cadeia alimentar marinha e servem como habitat para diversos organismos. Economicamente, a gama de aplicações é grande, sendo que novas aplicações vêm sendo descobertas na indústria farmacêutica, cosmética, alimentícia ou energética (BEETUL et al.; 2016).

As macroalgas são talófitas, ou seja, sem organização vascular, não possuem estruturas que em uma planta seriam representadas por folha, caule e raiz (LEE, 1999), e são divididas em três grandes grupos, Rhodophyta, Phaeophyta e Chlorophyta. Todas possuem em comum o pigmento clorofila do tipo *a* e tem como estrutura de parede celular a celulose, porém cada uma tem características próprias que as auxiliam na adaptação ao meio, como outros tipos de clorofila e materiais de reserva (REVIERS, 2006).

As Phaeophytas são as algas pardas e possuem como pigmentos acessórios clorofila *c*, carotenos e xantofila do tipo fucoxantina. Em sua parede celular, possuem o carboidrato estrutural alginato, o qual é muito utilizado na indústria de materiais ortodônticos, e a fucoidina, que possui propriedade de proteção contra a radiação ultravioleta e contra predadores (REVIERS, 2006). A ordem das algas pardas abriga cerca de 1700 espécies, é a maior dentro da classificação das macroalgas (GUIRY, 2012) e inclui a espécie alvo do presente trabalho.

Já as Chlorophytas são conhecidas como algas verdes e possuem como pigmentos acessórios clorofila *b*, xantofila do tipo luteína e carotenos. Em sua parede celular, possui apenas celulose como componente estrutural. As Rhodophytas são algas vermelhas que possuem como pigmentos acessórios a clorofila *d*, a ficoeritrina, ficocianina e aloficocianina, além dos carotenos, e xantofilas (zeaxantina e luteína), que lhes permitem absorver luz ultravioleta em regiões de maior profundidade (REVIERS, 2006).



### 2.3.1 Ordem Dictyotales e família Dictyotaceae

A ordem *Dictyotales* é uma das 13 do grupo *Phaeophyceae* e abrange diversas famílias, dentre elas *Dictyotaceae*, que possui 20 gêneros e mais de 100 espécies. Destacam-se os gêneros *Dictyopteris*, *Dictyota* e *Canistrocarpus*, que predominam em águas tropicais e subtropicais, contudo as algas pardas são amplamente distribuídas por todo o oceano, principalmente nas águas frias (CLERCK et al., 2006; SILBERFELD; ROUSSEAU; REVIERS, 2014; VALLIM et al. 2005).

Ao todo 18 espécies fazem parte do gênero *Dictyota*, as quais ainda são divididas em três grupos de acordo com o tipo de metabólitos por elas produzidos a partir da ciclização do geranyl-geraniol (CLERCK et al., 2006; TEIXEIRA 1988; VALLIM et al., 2005).

O grupo A é formado pelos compostos do grupo I (onde a ciclização do geranyl-geraniol ocorre entre os carbonos 1 e 10, formando os diterpenos do tipo germacrano prenilado. Estes podem sofrer contração no anel, gerando diterpenos do tipo xeniano e guaiano prenilado) e pelo grupo III, onde a ciclização ocorre entre os carbonos 2 e 10, formando os diterpenos do tipo xeniano (MESQUITA et al., 2015; TEIXEIRA, 1988; TEIXEIRA, 2013).

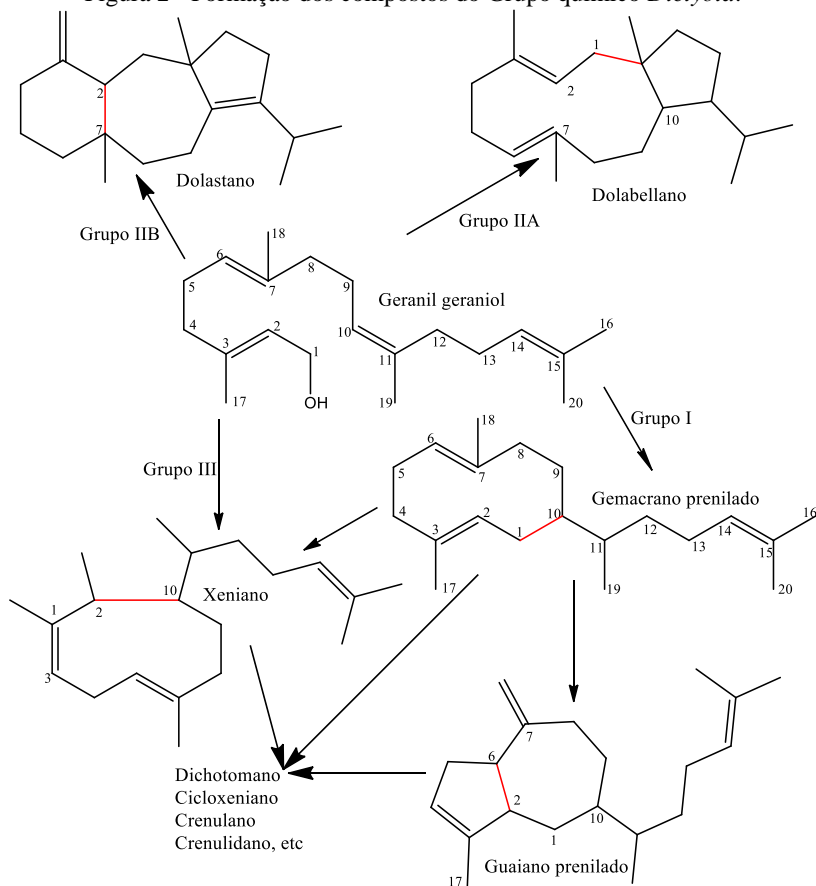
No grupo II, a ciclização ocorre entre os carbonos 1 e 11 ou 1 e 14, formando assim uma subdivisão dentro do grupo (IIA e IIB), sendo o grupo IIA formado pelos diterpenos dolabellanos e o IIB pelos dolastanos e secodoslastanos. Para o grupo IIC, onde se inclui o gênero *Canistrocarpus*, a formação de diterpenos é igual ao grupo II, contudo há diferença quanto a estereoquímica dos centros quirais, e observou-se também o fato das espécies produtoras de diterpenos do grupo IIA e IIB não produzirem a variação estereoquímica como a ocorrida em IIC, foi proposta mais esta classificação (TEIXEIRA, 1988; TEIXEIRA, 2013; DE CLERK et al., 2006).

Na revisão realizada por Vallim e colaboradores em 2005, é observada a relação entre as espécies, os metabólitos produzidos e a temperatura média da região oceânica em que são encontradas as espécies. Neste contexto, o grupo IIB apresenta ampla distribuição, aparecendo nas regiões tropicais e sub-tropicais tanto do oceano Pacífico como do oceano Atlântico; o grupo III aparece mais restrito às águas mornas do hemisfério sul, e frias do Pacífico, e que há uma tendência da reorganização do grupo I para o grupo III em águas tropicais e sub-tropicais do Pacífico.

A figura 2 mostra as diferentes possibilidades de ciclizações, propostas pelo grupo da professora Valéria Teixeira, da Universidade

Federal Fluminense (TEIXEIRA, 1988; TEIXEIRA, 2013; VALLIM et al., 2005; MESQUITA et al., 2015).

Figura 2 - Formação dos compostos do Grupo químico *Dictyota*.

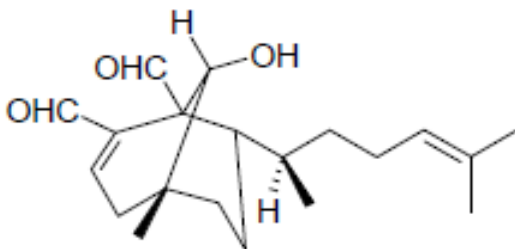


Fonte: Adaptado de MESQUITA et al. (2015) e TEIXEIRA (2013).

Os diterpenos isolados de algas pardas vêm aumentando com o tempo. Em 2005, Vallim e colaboradores fizeram a estimativa de existirem 300 compostos desta classe, encontrados em 35 espécies da família *Dictyotaceae*. Em 2014, o grupo de Cheng e colaboradores estimaram 400 diterpenos divididos em 15 classes, apenas para o gênero *Dictyota* (CHENG et al., 2014; VALLIM et al., 2005).

O grupo A, ao qual pertence *D. mertensii*, engloba cinco espécies, sendo elas *Dictyota mentruialis*, *D. ciliolata*, *D. guineensis*, *D. crenulata*, para as quais já foram identificados aproximadamente 50 compostos, dentre os quais destaca-se o (6*R*)-6-acetoxidichotoma-3,14-dieno-1,17-dial (FIGURA 3) por possuir promissora atividade biológica anti-HIV1 (TEIXEIRA; CAVALCANTI; PEREIRA, 2001; VALLIM et al., 2005).

Figura 3 - Estrutura do composto (6*R*)-6-acetoxidichotoma-3,14-dieno-1,17-dial



Fonte: VALLIM et al. (2005).

### 2.3.1.1 Espécie *Dictyota mertensii* (C. Martius) Kützing

Esta espécie foi descrita originalmente por Martius (1828) como *Ulva mertensii* e reclassificada por Kützing em 1859. Tem ainda como sinônimas os binômios *Dictyota dentata* J.V. Lamouroux, *Dictyota subdentata* Kützing, *Dictyota brongniartii* J. Agardh e *Zonaria martii* Mertens (GUIRY e GUIRY, 2017). A figura 4 mostra o aspecto morfológico da alga em estudo.

Para a espécie *Dictyota mertensii* foram descritos diterpenos do tipo guaiano-prenilado, o que faz com que, segundo a classificação de Teixeira (1988), ela seja enquadrada no grupo A de metabólitos, dentro da divisão do grupo químico *Dictyota*.

Os estudos químicos com a *D. mertensii* permitiram o isolamento dos seguintes compostos: pachidictyol A (**1**), isopachidictyol A (**2**), epoxipachidictyol A (**3**), dictyol B (**4**), adipato de bis (2-(2-butoxi)etoxi) etila (**5**), dictyol C (**6**), dictyol H (**7**), acetato de dictyol B (**8**), dictyóxi (**9**) e 10-acetoxi-18-hidroxiolabela-2,7-dieno (**10**), apresentados na Figura 5 (KOLECOM; TEIXEIRA; PITOMBO, 1991; VALLIM et al., 2007; FREITAS et al., 2007; PHILIPPUS, 2016).

Figura 4- Aspecto geral dos talos da alga *Dictyota mertensii*.

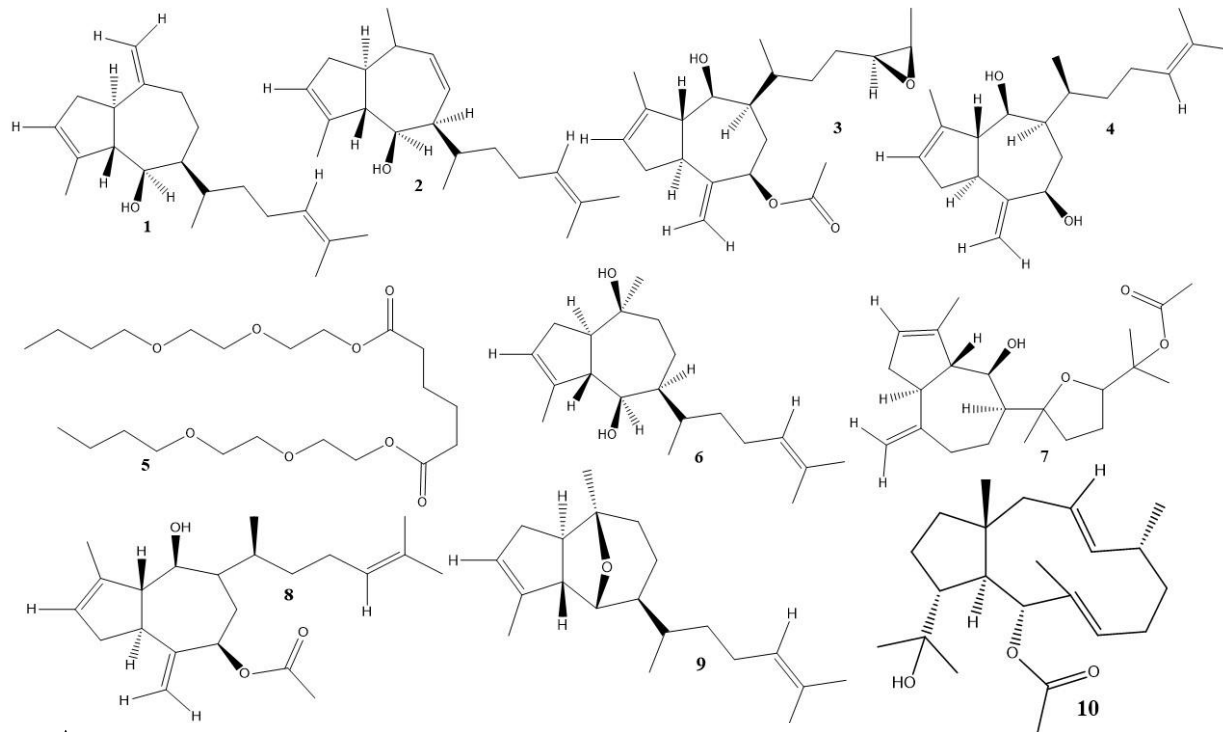


1- Hábito 2- Talos 3,4- Algas em crescimento em fazenda de cultivo de lagosta (VIETNÃ)

Fonte: GUIRY e GUIRY, 2017.

No estudo realizado por Kolecom, Teixeira e Pitombo em 1991, em que foi determinada a sinonímia entre as algas *D. mertensii* e *D. dentata*, os autores propuseram que o dictyol H seria um marcador taxonômico para a espécie, uma vez que só havia até então sido descrito para a alga *D. dentata*. Contudo, no estudo de Freitas (2006), a presença de tal composto somente foi observado em dois extratos avaliados por Freitas, que comparou o perfil químico de cinco locais de coleta ao longo da costa brasileira, sendo quatro pontos no litoral e uma ilha oceânica, a de Atol das Rocas / RN, o que mostra as possibilidades de variação química intraespécie.

Estudos anteriores mostram diferentes atividades para a espécie. O extrato mostrou atividade leishmanicida (ALIANÇA et al. 2014), antimicrobiana e citotóxica (PHILIPPUS, 2016). O polissacarídeo sulfatado do tipo fucano mostrou atividade antirretroviral (QUEIROZ et al., 2008). Outra atividade relatada para o extrato de *D. mertensii* foi a atividade anti-herbivoria e anti-incrustante (Marques, Vilaça e Crespo, 2006), enquanto Freitas e colaboradores (2007) relatam esta atividade para os diterpenos isolados no tabalho.

Figura 5- Estruturas de alguns metabólitos isolados da alga *D. mertensii*.

Fonte: Autor.

## 2.4 ATIVIDADE CITOTÓXICA

Os diferentes tipos de câncer vêm criando a cada dia novas necessidades para o desenvolvimento de fármacos. A resistência aos tratamentos e os severos efeitos colaterais geram complicações na clínica. O desenvolvimento de um fármaco novo que seja potente contra as células anormais, mas que não ataque as saudáveis, que possua reduzidos efeitos colaterais e com a toxicidade aceitável é emergente (COSTA-LOTUFO et al., 2009; SOARES et al 2011; RANDALL; CABLE, 2015).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), são esperados 600 mil novos casos no Brasil para o ano de 2018, sendo as regiões sul e sudeste as mais atingidas (INCA, 2018). Outros dados mostram que a mortalidade aumentou no período de 2010-2015 (INCA, 2018 a). Outras estimativas do Instituto mostram que a faixa etária influencia o tipo de câncer mais comum; por exemplo, o câncer de mama (28 % do total de neoplasias em mulheres) tem incidência maior na faixa etária entre 40-50 anos. Já o câncer de cólon de útero (segunda maior incidência entre as brasileiras) acomete maior número de mulheres de 35 a 59 anos. As leucemias, por sua vez, atingem mais os jovens até 35 anos (INCA, 2018b).

O interesse em protótipos para o desenvolvimento de antitumorais a partir de organismos marinhos é baseado em um levantamento realizado pelo NCI, denominado NCI 60. O grande desempenho de fármacos disponíveis no mercado atualmente derivados de estruturas marinhas e a variedade estrutural dos compostos que são encontrados nos oceanos também justificam o interesse (RANGEL; FALKENBERG, 2015; BLUNT et al. 2017; NEWMAN; CRAGG, 2014).

Neste cenário, é importante a realização de testes que avaliam o potencial citotóxico dos compostos isolados a partir de PNM. Para este fim, existem atualmente diversas metodologias, podendo ser citadas os testes com o sal de MTT, o qual é uma análise colorimétrica e mensura a viabilidade celular; o teste de exclusão do azul de triptano, o qual cora apenas as células danificadas ou mortas, visto que células viáveis por ter sua parede celular intacta não permitem a entrada do corante; e o teste de letalidade com artemia (*Artemia salina*) são outras metodologias muito utilizadas para uma triagem de moléculas com potencial citotóxico.

### 3 Materiais e métodos

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Material Biológico

As algas foram coletadas em parceria no âmbito do projeto ProspecMar, com mergulho autônomo na profundidade de até 30 m, na Ilha da Trindade, Espírito Santo- Brasil, em agosto de 2014 e acondicionadas sob refrigeração até o transporte para o laboratório. A identificação da alga foi realizada pelo Professor Paulo Horta (BOT-CCB-UFSC), a excisada do material é mantida no Herbário do Departamento de Botânica da UFSC sob a identificação FLOR-58468.

Outro ponto de coleta foi o arquipélago de Fernando de Noronha/PE, na praia da Sapata, em outubro de 2016. A identificação da alga foi realizada pela Dra. Cintia Lhullier, a excisada do material está depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFSC sob o registro FLOR-63022. A figura 6 mostra os diferentes pontos de coleta.

Figura 6 - Local de coleta das amostras de *D. mertensii* utilizadas neste trabalho.



Fonte: GOOGLE EARTH- acesso em 28/01/2018.

### 3.1.2 Solventes, reagentes e adsorventes

Os solventes utilizados para extração, e como fase móvel para cromatografias, foram de grau analítico das marcas VETEC<sup>®</sup>, LAFAN<sup>®</sup>, QHEMIS<sup>®</sup>.

Como fase estacionária para colunas cromatográficas do tipo clássica (CC) e a vácuo (CLV) e de média pressão (Sepacore<sup>®</sup>) foi utilizada sílica gel 60 da marca SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup>, com tamanho de partícula na faixa de 0,04 a 0,063 mm. As placas para cromatografia em camada delgada (CCD) foram cromatoplasmas de sílica gel 60 F<sub>254</sub> com base em alumínio, das marcas SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup> e SILICYCLE<sup>®</sup>.

Como agentes reveladores para CCD foram utilizados luz ultravioleta (UV) nos comprimentos de onda de 365 e 254 nm, e solução de anisaldeído-sulfúrico preparada no laboratório com reagentes de grau analítico.

Quando necessário, para purificação final dos compostos foi utilizada coluna, para cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de gel de sílica, da marca Supelcosil<sup>®</sup>, nas dimensões de 25 cm x 10 mm, com diâmetro médio de partícula de 5 µm e solventes de grau de pureza HPLC. Para a extração em fase sólida, previamente à purificação por CLAE foram usados cartuchos da Supelclean<sup>™</sup> LC-Si.

Para a realização dos espectros de ressonância magnética nuclear foram utilizados clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>-*d*) das marcas SIGMA-ALDRICH<sup>®</sup> e CAMBRIDGE ISOTOPE LABORATORIES<sup>®</sup>

### 3.1.3 Equipamentos

Os extratos e as frações foram concentrados em rotaevaporadores da marca BÜCHI<sup>®</sup> com aquecimento até 40 °C. Para os fracionamentos foram utilizadas colunas do tipo aberta e sistema de média pressão SEPACORE/Syncore<sup>®</sup>. A câmara de revelação ultravioleta para CCD foi do modelo PRODICIL<sup>®</sup> VA 50.

Para a purificação de compostos por CLAE foi utilizado cromatógrafo com detector por absorção de Ultravioleta modelo Shimadzu SPD-10AV e SCL-10A, respectivamente.

As análises de RMN foram realizadas em espectrômetro de ressonância magnética (RMN), modelo Bruker modelos AC 200, Fourier 300 e DRX 400.



## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Extração

O material coletado foi congelado para transporte até o laboratório. As algas foram descongeladas, lavadas em água corrente para remoção do sal, epífitas e outros organismos marinhos, depois colocadas para secar sob ar frio. As algas secas foram rasuradas e postas em maceração ao abrigo da luz com diclometano/metanol na proporção 2:1 durante o período de sete (7) dias, sendo o recipiente mantido fechado, sob abrigo da luz e agitado periodicamente. Após esse período, houve a filtração do extrato parcial e a renovação do solvente para repetir a maceração até esgotamento do material.

Este procedimento foi o mesmo para todos os extratos, a partir de material de diferentes procedências ou estados vegetativos.

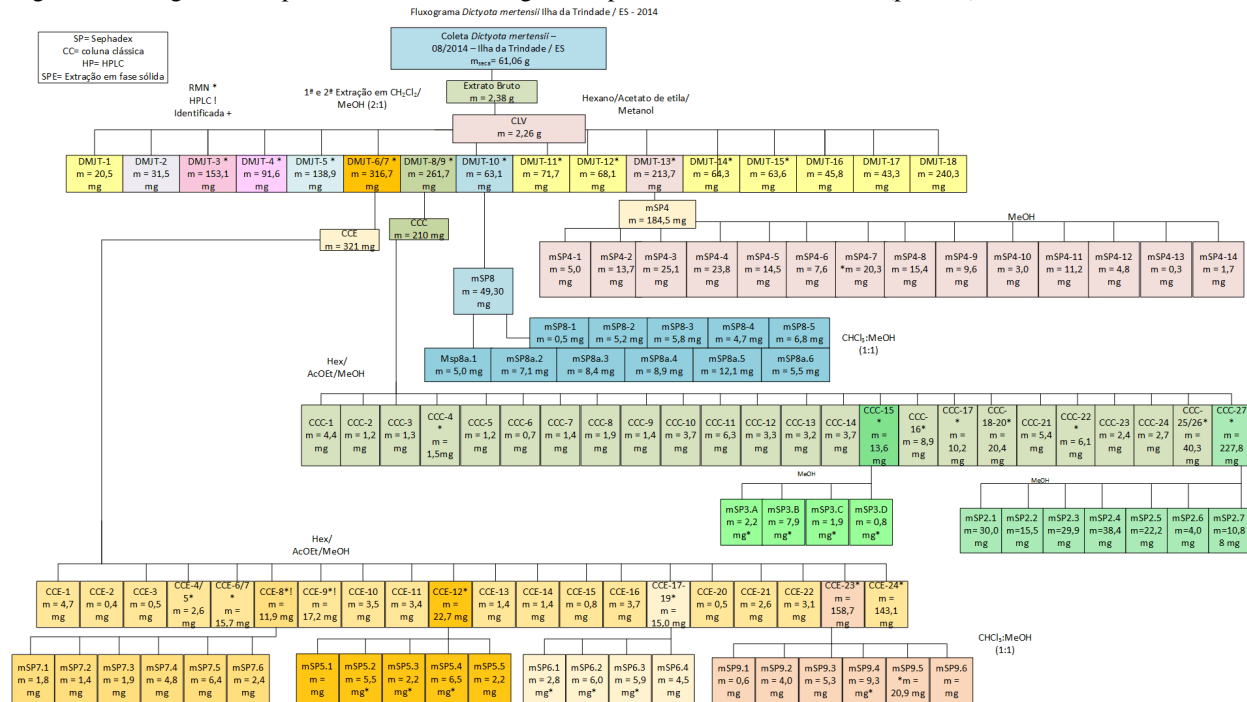
Para o material oriundo da ilha de Fernando de Noronha, afim de maximizar a extração, foi realizada uma terceira maceração apenas com metanol (MeOH).

### 3.2.2 Fracionamento cromatográfico visando o isolamento de compostos do extrato DMJT

O fluxograma 1 partes A e B (Figuras 7 e 8), apresentam de forma resumida todos os procedimentos cromatográficos realizados para o extrato obtido da alga coletada na Ilha da Trindade.

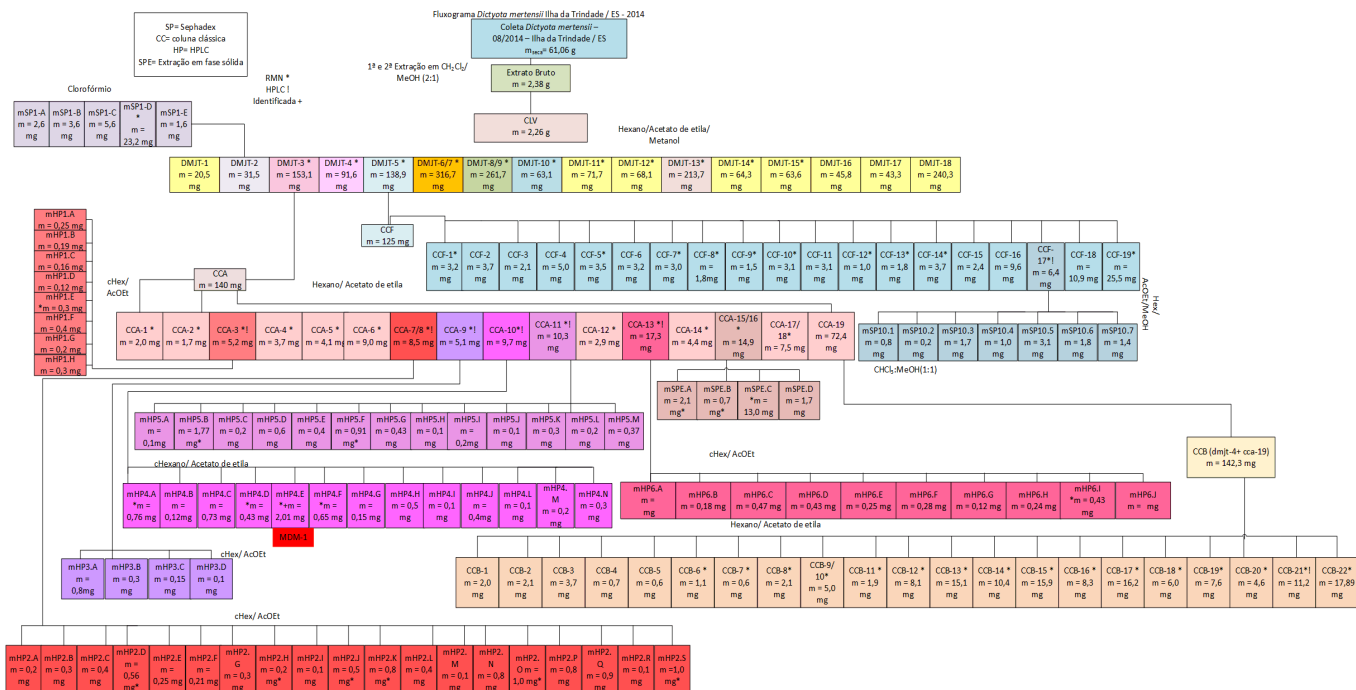


Figura 7- Fluxograma dos procedimentos cromatográficos para o extrato bruto DMJT (parte A)



Fonte: Autor.

Figura 8 - Fluxograma dos procedimentos cromatográficos para o extrato bruto DMJT (parte B).



Fonte: Autor.

### 3.2.2.1 Cromatografia líquida a vácuo (CLV) do extrato bruto DMJT

Para a cromatografia líquida a vácuo, o extrato seco da amostra DMJT (*Dictyota mertensii* da Ilha da Trindade) foi incorporado a sílica gel até a distribuição homogênea (pastilha). A coluna utilizada tinha o diâmetro de 5,5 cm, altura de 5,5 cm e a pastilha com a amostra tinha 0,5 cm de espessura. A sequência de solventes descrita na tabela 1 para o primeiro extrato produzido (CLV-DMJT) foi utilizada também para os outros extratos, podendo variar os volumes em função da quantidade de extrato bruto a ser fracionada na CLV.

Tabela 1- Esquema de solventes utilizados para CLV-DMJT.

Frações	Fase móvel	Volume (mL)
1	Hex 100%	300
2	Hex 95:5 AcOEt	200
3	Hex 9:1 AcOEt	200
4-5	Hex 85:15 AcOEt	2 X 100
6-7	Hex 8:2 AcOEt	2 X 100
8-10	Hex 7:3 AcOEt	3 X 100
11-12	Hex 6:4 AcOEt	2 X 100
13	Hex 1:1 AcOEt	300
14	Hex 3:7 AcOEt	100
15	Hex 2:8 AcOEt	100
16	AcOEt 100%	100
17	MeOH 100%	100
18	MeOH 1:1 H <sub>2</sub> O	200

Fonte: Autor.

### 3.2.2.2 Coluna aberta CCA

A amostra processada nesta coluna foi a fração 3 da CLV-DMJT. A coluna escolhida possuía diâmetro de 1,5 cm e foi preenchida com sílica gel, sendo a altura final de 35 cm. Utilizou-se fluxo de 1 mL/minuto e o volume de cada fração foi de 3 mL. A coluna foi empacotada com auxílio

da fase móvel hexano e acetato de etila na proporção 99:1. O sistema de solventes empregado nesta coluna é descrito na tabela 2.

Tabela 2 - Esquema de solventes utilizados para CCA.

Frações	Fase móvel	Volume (mL)
1-28	Hex 99:1 AcOEt	100
29-55	Hex 98:2 AcOEt	100
56-82	Hex 97:3 AcOEt	100
83-95	Hex 96:4 AcOEt	50
96-121	Hex 95:5 AcOEt	100
122-132	AcOEt 100%	100

Fonte: Autor.

### 3.2.2.3 Purificação por CLAE de frações de CCA.

As frações 3, 7/8, 9, 10, 11 e 13 foram submetidas ao processo de purificação por CLAE (ver tabela 3), sendo injetados 250  $\mu\text{L}$  por análise, a concentração igual a 10 mg/mL. O tempo de análise era de 40 minutos cada e o fluxo igual a 1 mL/min, a leitura foi realizada com detector UV em 210 nm.

Tabela 3 - Purificação por CLAE das frações de CCA.

Fração	Fase móvel	Número de injeções
3	cHex 97:3 AcOEt	3
7-8	cHex 97:3 AcOEt	2
9	cHex 97:3 AcOEt	2
10	cHex 97:3 AcOEt	3
11	cHex 97:3 AcOEt	2
13	cHex 8:2 AcOEt	2

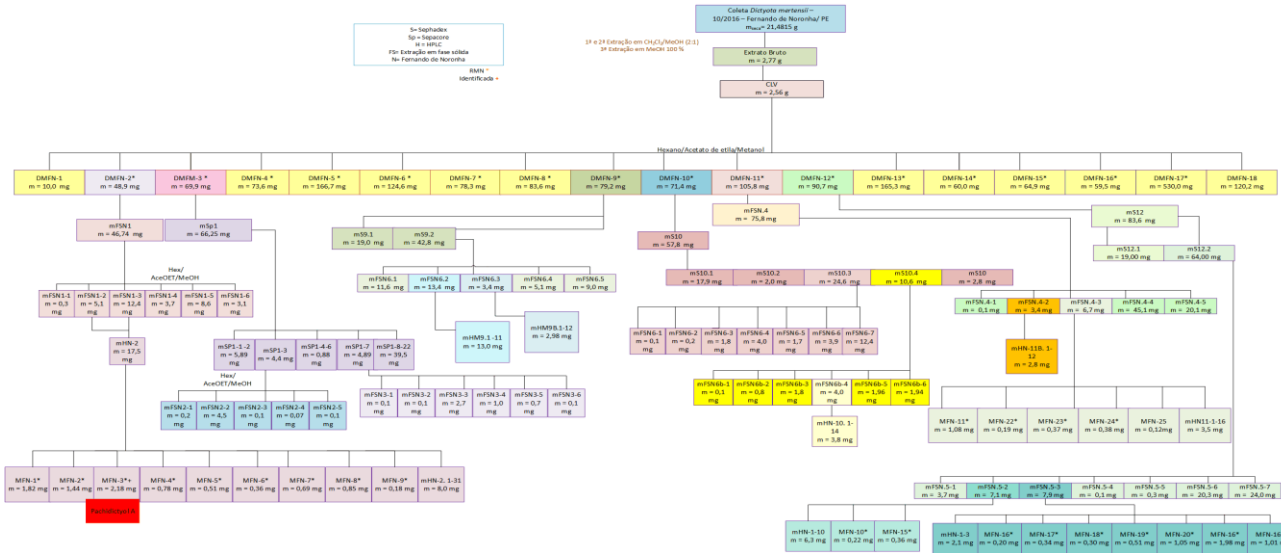
Fonte: Autor.

### **3.2.3 Fracionamento cromatográfico visando o isolamento de compostos do extrato DMNF**

O fluxograma 2 (Figura 9), apresenta de forma resumida todos os procedimentos cromatográficos realizados para o extrato obtido da alga coletada em Fernando de Noronha.

Figura 9 - Fluxograma dos procedimentos cromatográficos para o extrato bruto DMFN.

Fluxograma Ditozato metereuol Arquiêlago de Fernando de Noronha (Pala da Sapata) / PE - 2016



Fonte: Autor.



### 3.2.3.1 Cromatografia líquida a vácuo do extrato bruto DMFN

Para o fracionamento do extrato bruto da alga coletada em Fernando de Noronha foi utilizado um funil de vidro sinterizado com diâmetro de 5,5 cm, preenchido com sílica 60 até atingir 5 cm de altura. Para aplicação da amostra, foi preparada uma pastilha (0,5 cm de espessura) com o extrato, usando o mesmo tipo de sílica. A massa do extrato aplicada foi igual a 2,56 g. A tabela 4 descreve o esquema de solventes utilizados.

Tabela 4 - Esquema de solventes utilizados na CLV – DMFN.

Frações	Fase móvel	Volume (mL)
1	Hex 100%	200
2	Hex 95:5 AcOEt	200
3	Hex 9:1 AcOEt	200
4-5	Hex 85:15 AcOEt	2 X 100
6-7	Hex 8:2 AcOEt	2 X 100
8-10	Hex 7:3 AcOEt	3 X 100
11-12	Hex 6:4 AcOEt	2 X 100
13	Hex 1:1 AcOEt	300
14	Hex 3:7 AcOEt	100
15	Hex 2:8 AcOEt	100
16	AcOEt 100%	100
17	MeOH 100%	100
18	MeOH 1:1 H <sub>2</sub> O	200

Fonte: Autor.

### 3.2.3.2 Extração em fase sólida da fração DMNF-2 (FSN-1)

A fração DMFN-2 foi submetida a uma extração em fase sólida a fim de dividi-la em frações menores para uma melhor resolução na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para tal, o cartucho de extração foi embebido previamente com ciclohexano puro e, em seguida, a amostra foi aplicada. Para a separação utilizou-se o esquema de solventes apresentado na tabela 5.

Tabela 5- Esquema de solventes para a FSN-1.

Frações	Fase móvel	Volume (mL)
1	cHex 100 %	1
2-4	cHex 99:1 AcOEt	3
5-7	Hex 9:1 AcOEt	3
8	AcOEt 100 %	1
9	MeOH 100 %	1

Fonte: Autor.

### 3.2.3.3 Coluna em Sephadex da fração DMFN-12 (SP-12)

A fração da CLV 11 do extrato de Fernando de Noronha, foi submetido a uma coluna de Sephadex LH20 a fim de separar o máximo de clorofila possível, para otimizar os demais procedimentos. Foi utilizado como fase móvel metanol 100 %.

### 3.2.3.4 Extração em fase sólida da fração DMFN-11 (FSN-4)

A fração 11 da CLV-DMFN foi escolhida por apresentar na CCD os componentes de interesse, a extração foi realizada para obter frações menores, e otimizar as próximas etapas. O cartucho de extração foi previamente embebido com a fase móvel cHex : AcOEt (8:2). O esquema de solventes é apresentado na tabela 6.

Tabela 6- Esquema de solventes para a FSN-4.

Frações	Fase móvel	Volume (mL)
1,2	cHex 8:2 AcOEt	2
2,3,4	Hex 7:3 AcOEt	3
5,6	Hex 6:4 AcOEt	2
7,8	100 % AcOEt	3
9	100 % MeOH	2

Fonte: Autor.

### 3.2.3.5 Extração em fase sólida da fração SP-12 (FSN-5)

A fração 2 da coluna SP-12 foi escolhida por apresentar na CCD os componentes de interesse, e encontrar-se livre de clorofila. A extração foi

realizada para obter frações menores, e otimizar as próximas etapas. A amostra foi dividida em 2 partes para que fosse obtido o máximo de rendimento. O cartucho de extração foi previamente embebido com a fase móvel cHex: AcOEt (8:2). O esquema de solventes é apresentado na tabela 7.

Tabela 7 - Esquema de solventes para FSN-5.

Frações	Fase móvel	Volume (mL)
1	cHex 8:2 AcOEt	1
2,3,4	Hex 75:25 AcOEt	3
5,6	Hex 6:4 AcOEt	2
7,8	100 % AcOEt	2

Fonte: Autor.

### 3.2.3.6 CLAE da fração FSN-1.2/3

Para a purificação por CLAE, foi escolhida a fração 2 da FSN-1 devido ao seu rendimento e perfil cromatográfico; dessa forma, ela foi submetida a 8 injeções no cromatógrafo, sendo eluída em cHex 98,5:1,5 AcOEt, por 60 minutos. O fluxo aplicado foi de 1 mL/min, o volume injetado era de 500 µL e a concentração igual a 10 mg/mL. Para a detecção, foi utilizado o comprimento de onda de 210 nm.

### 3.2.3.7 CLAE da fração FSN-4.3

Para a purificação por CLAE, foi escolhida a fração 3 da FSN-3 devido ao seu rendimento e perfil cromatográfico; dessa forma, ela foi submetida a 3 injeções no cromatógrafo, sendo eluída em cHex 65:35 AcOEt, por 60 minutos. O fluxo aplicado foi de 1 mL/min, o volume injetado era de 500 µL e a concentração igual a 10 mg/mL. Para a detecção, foi utilizado o comprimento de onda de 210 nm.

### 3.2.3.8 CLAE da fração FSN-5.3

Para a purificação por CLAE, foi escolhida a fração 3 da FSN-4 devido ao seu rendimento e perfil cromatográfico; dessa forma, ela foi submetida a 3 injeções no cromatógrafo, sendo eluídas em cHex 7:3

AcOEt, por 60 minutos. O fluxo aplicado foi de 1 mL/min, o volume injetado era de 500  $\mu$ L, a concentração igual a 10 mg/mL. Para a detecção foi utilizado o comprimento de onda de 210 nm.

### 3.2.4 Identificação e elucidação estrutural dos compostos isolados

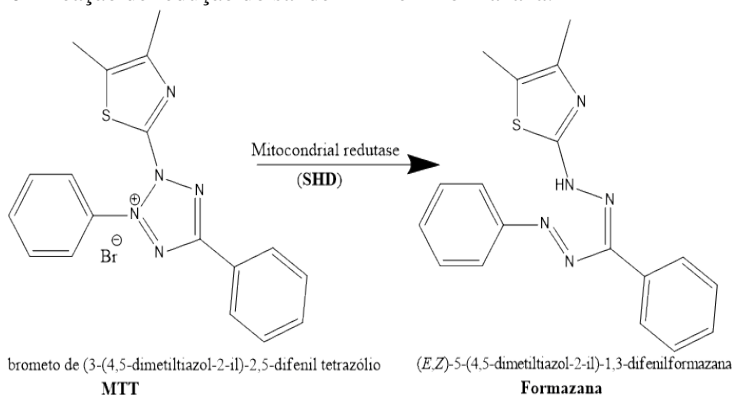
A identificação e elucidação estrutural das substâncias isoladas foi realizada através de análise de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , além dos experimentos bidimensionais, como HSQC e HMBC, comparando-se os dados obtidos com dados da literatura e também com auxílio da base de dados MarinLit<sup>®</sup>.

### 3.2.5 Atividade biológica – ensaio de citotoxicidade

A atividade biológica do extrato bruto foi avaliada segundo a metodologia descrita a seguir pelo grupo parceiro da UFC (Universidade Federal do Ceará), coordenado pelo professor Diego Wilke.

O ensaio de citotoxicidade baseia-se na mensuração da absorbância da formazana, de coloração púrpura, formada após a metabolização do sal de MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), que é amarelo, pelas células tumorais viáveis, a figura 9 ilustra a reação mediada pela enzima redutase mitocondrial (Mosmann, 1983), conforme o esquema apresentado na figura 10.

Figura 10 - Reação de redução do sal de MTT em Formazana.



Fonte: Autor.

As células tumorais de carcinoma de colón humano HCT-116 foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Em seguida foram plaqueadas em placas de 96 poços e expostas às amostras por 72 horas. Após o término do tempo de incubação, o sal de MTT (0,5 mg/mL) foi adicionado e a absorbância mensurada a 595 nm. A triagem inicial foi realizada utilizando a concentração de 50 µg/mL das amostras para avaliar a porcentagem de inibição do crescimento da célula tumoral. Para amostras que demonstraram inibição maior que 75%, o valor da concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) foi calculado por regressão não linear utilizando o *GraphPadPrism 5.0 (Intuitive Software for Science)*.

Os compostos, extratos e frações que obtiveram resultado promissor com a linhagem HCT-116 foram testadas pela mesma metodologia, frente às linhagens celulares de melanoma metastático murino B16-F10, câncer de próstata metastático humano PC3-M, além da linhagem de células normais, que neste estudo foi de células de rim embrionário 293A. O fármaco padrão positivo utilizado no ensaio foi a doxorubicina, o qual teve os mesmos parâmetros de análise.

## 4 RESULTADOS

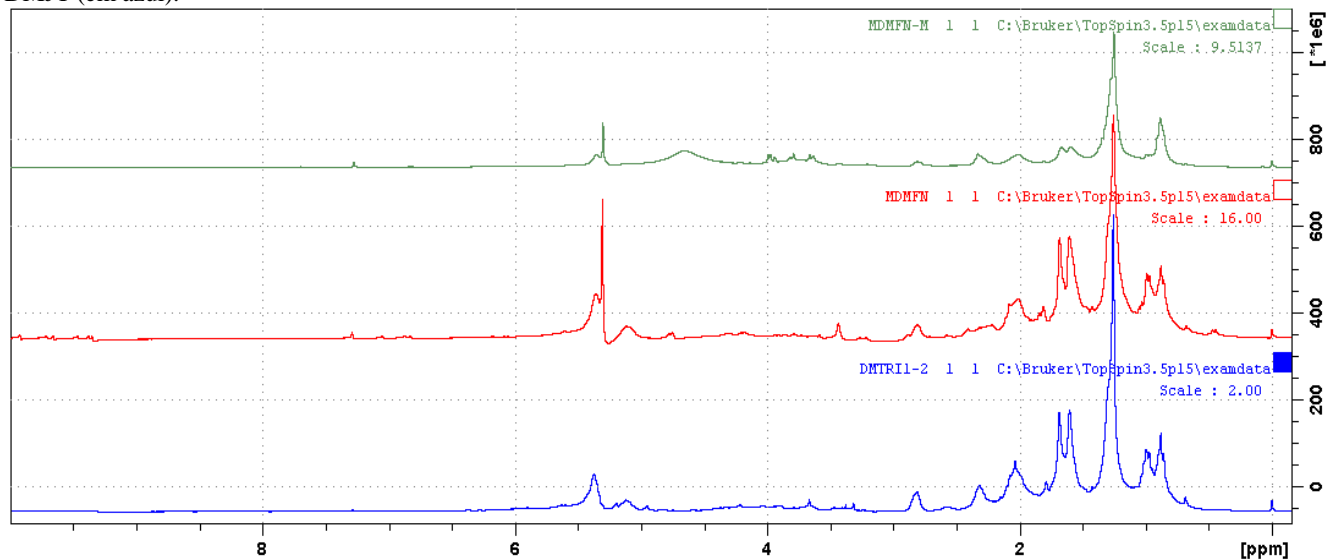
### 4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

A amostra coletada na Ilha da Trindade/ES foi denominada DMJT e, após a secagem das algas, a massa total obtida foi de 61,06 g. Este material foi extraído apenas com a mistura diclorometano/metanol 2:1, tal como realizado por Philippus (2016), que partiu aproximadamente da mesma quantidade de alga e obteve rendimento de 8,9% (m/m). Entretanto, o extrato bruto obtido da DMJT (*Dictyota mertensii* “jovem” da Trindade) apresentou menor rendimento, com peso total de 2,38 g (aproximadamente 3,9% m/m). Esta diferença no rendimento de extração pode dever-se, eventualmente, à diferença no estágio de desenvolvimento, já que o material investigado no âmbito deste projeto foi obtido de algas jovens, que, inclusive se distinguiam visualmente das demais identificadas como *Dictyota mertensii* e chegaram a ser consideradas, inicialmente como uma espécie distinta.

A amostra coletada em Fernando de Noronha/PE foi denominada MDMFN e correspondia a algas “maduras” e, após a secagem, a massa total obtida foi de 21,48 g de alga seca. Devido à quantidade ser bastante reduzida, optou-se por realizar ao final das macerações em diclorometano/metanol, uma terceira maceração apenas com metanol, visando aumentar o rendimento da extração e esgotar o material. A extração em diclorometano/metanol (2:1) resultou em 2,18 g de extrato (aproximadamente 10% m/m), já o extrato metanólico rendeu 0,653 g (3% m/m), e foi chamado de MDMFN-M.

A figura 11 mostra o perfil dos três extratos através da espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ , sendo possível observar a ausência de sinais na região acima de 8 ppm no extrato de *D. mertensii* da Ilha da Trindade (em azul), que aparecem no extrato da mesma espécie coletada em Fernando de Noronha (em vermelho). Tal diferença sugere uma composição química diferente em relação aos metabólitos secundários minoritários.

Figura 11- Espectros de RMN de hidrogênio comparativo dos extratos brutos MDFMN-M (em verde), MDMFN (em vermelho) e DMJT (em azul).



Fonte: Autor.

## 4.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO DMJT

O fracionamento preliminar do extrato DMJT foi realizado por cromatografia líquida a vácuo (CLV), que foi seguida por cromatografias em coluna clássica (CC), as quais foram designadas por letras em ordem alfabética crescente (CCA, CCB, etc).

### 4.2.1 CLV-DMJT

Ao todo foram aplicados 2,26 g de extrato e coletadas 18 frações. Devido ao perfil cromatográfico apresentado e também aos espectros de hidrogênio obtidos por RMN, as frações 6 e 7, 8 e 9 foram reunidas, as demais mantiveram-se separadamente. A partir destas análises preliminares foram escolhidas as frações que foram utilizadas nas colunas seguintes.

A fração 2 da CLV-DMJT (31,5 mg) mostrou-se bem apolar e de baixa complexidade, sendo realizada uma tentativa de purificação por filtração em gel de Sephadex LH-20 (M<sub>Sp</sub>1).

A fração 3 da CLV-DMJT (153,1 mg) apresentou aspecto de um óleo amarelo, cujo perfil cromatográfico foi considerado interessante devido a presença de compostos com extinção de fluorescência e/ou fluorescência. A análise do espectro de <sup>1</sup>H RMN mostrou sinais sugestivos de terpenos (metilas na região de 1-2 ppm). Outros sinais observados no espectro de <sup>1</sup>H RMN considerados interessantes foram os dupletos próximos a 6 e 5 ppm, que se caracteriza por ser uma região de hidrogênios olefínicos, além de multipletos e dupletos na região de 4 ppm, caracterizando a presença de átomos eletronegativos próximos ao hidrogênio (PAVIA et al., 2015).

A fração 4 da CLV-DMJT (91,6 mg) apresentou aspecto de um óleo amarelo-esverdeado, cujo perfil cromatográfico foi considerado interessante pela presença de extinção de fluorescência. No espectro de <sup>1</sup>H RMN a presença de metilas abaixo de 2 ppm é sugestiva de terpenos, e dupletos na região entre 4 e 5 ppm indicam a presença de hidrogênios desblindados (PAVIA et al., 2015).

Na fração 6/7 da CLV-DMJT (322 mg) os sinais encontrados no <sup>1</sup>H RMN, assim como as frações anteriormente descritas, também eram sugestivos de terpenos, apresentando metilas na região entre 1-2 ppm, outros sinais que chamaram a atenção foram os do tipo dupletos e tripletos na região compreendida entre 3 e 4 ppm e sinais na região de 5 ppm sugerindo a presença de insaturação e átomos eletronegativos próximo ao hidrogênio (PAVIA et al., 2015). Quando se analisou em CCD a fração



em questão, foram observados vários compostos que apresentaram extinção de fluorescência.

As frações 8 e 9 da CLV-DMJT (210 mg) apresentaram aspecto de uma graxa de cor verde. Seus perfis cromatográficos foram considerados interessantes em função da presença de compostos com extinção de fluorescência. O espectro de RMN mostrou sinais que apontam a presença de terpenos na fração (metilas na região de 1-2 ppm), além de sinais na região de 5 ppm, dupletos e tripletos na região entre 3 e 4 ppm. Nesta fração também se destaca a presença de um duplete acima de 6 ppm, que é sugestivo de dupla ligação em anel (PAVIA et al., 2015).

#### 4.2.2 Coluna CCA

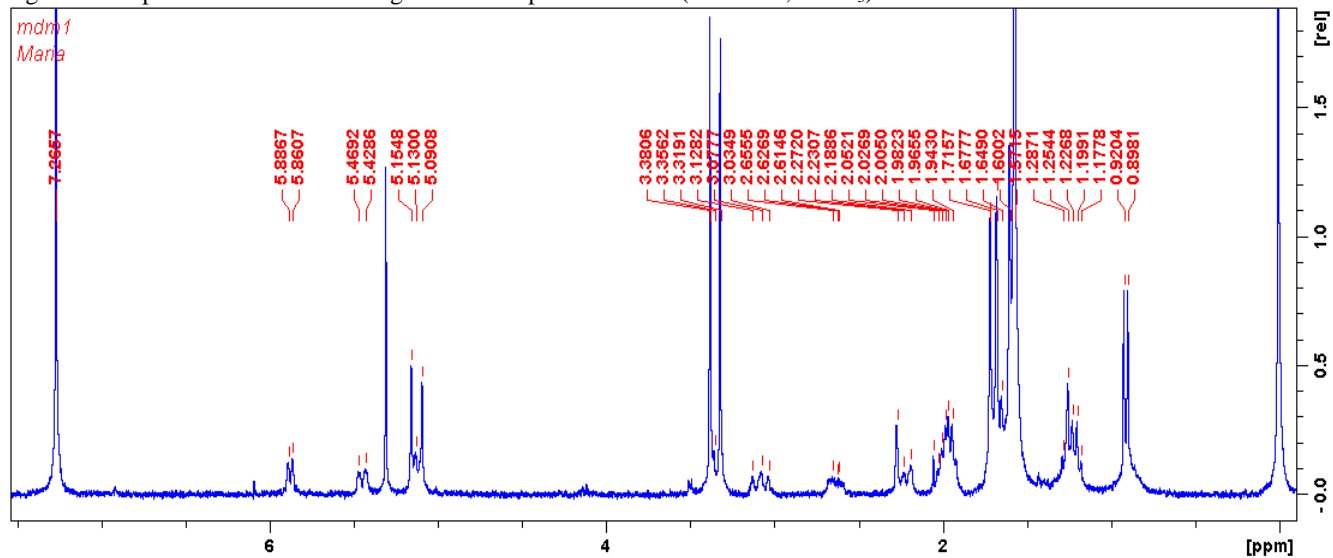
Na CCA foram coletadas 132 frações que, após análise por CCD e RMN de hidrogênio, foram reunidas em um total de 19 frações, sendo a fração CCA 19 reunida com a fração 4 da MCLV-DMJT devido a sua semelhança. Destas 18 frações, 17 foram submetidas a análise por RMN de hidrogênio, e então foram reunidas novamente as frações 1 e 2, 7 e 8, 15 e 16, 17 e 18.

Foram selecionadas para a etapa de purificação por CLAE as frações CCA-3, CCA-7/8, CCA-9, CCA-10, CCA-11, CCA-13, CCA-15/16. Tais frações apresentam sinais no espectro de RMN de hidrogênio que sugerem a presença de metabólitos da classe dos terpenos, como observado nos trabalhos de Freitas e colaboradores (2007) e Philippus (2016).

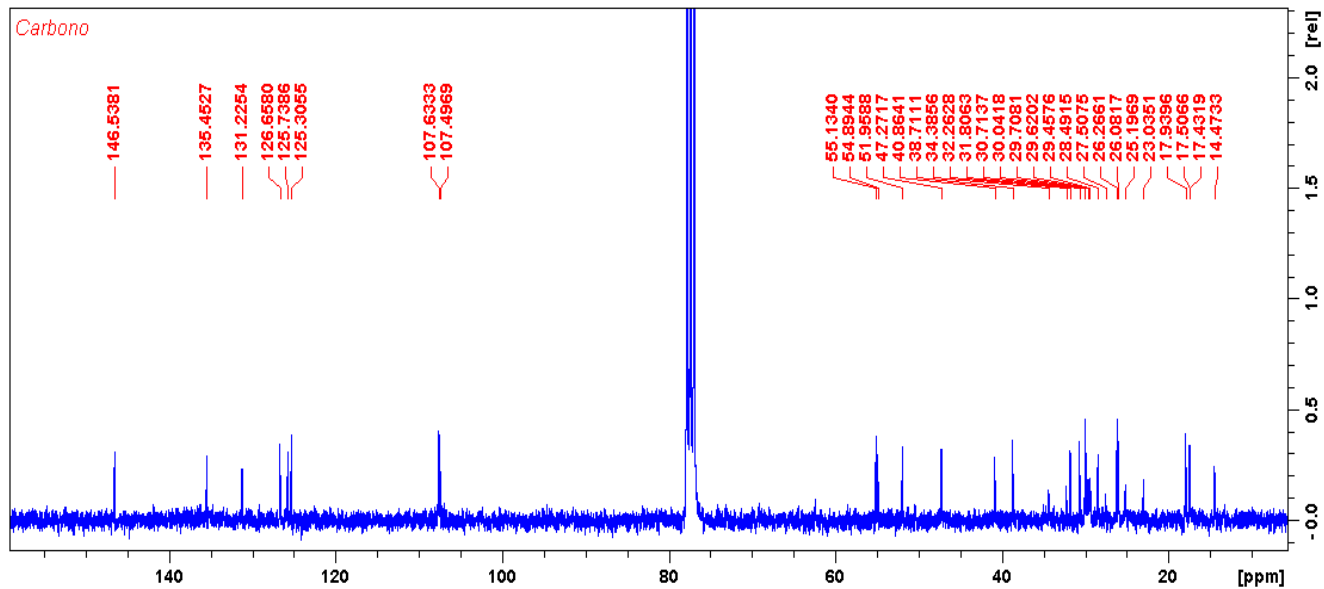
A fração CCA-10 (9,7 mg), quando observada em CCD, aparentou estar pura, com Rf 0,33 na fase móvel hexano/acetato de etila (95:5), apresentando extinção de fluorescência. Logo após a revelação com anisaldeído sulfúrico, apresentou cor roxa, que se tornou marrom com o passar do tempo. Este composto foi denominado MDM-1.

##### 4.2.2.1 Identificação estrutural do composto MDM-1

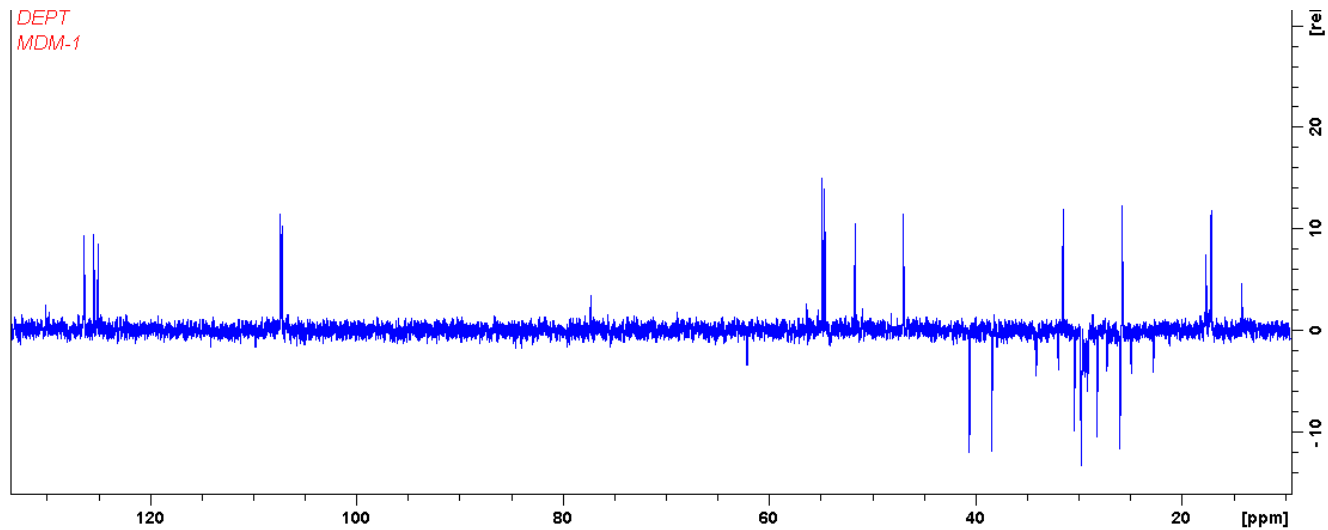
Para a CCA-10 foram obtidos espectros de RMN de hidrogênio (Figura 12) e carbono 13 (Figura 13 e 14), além dos experimentos bidimensionais HSQC (Figura 16) e HMBC (Figura 17). Os dados espectrais sugerem a presença de um componente majoritário, cuja estrutura conteria 3 insaturações, correspondendo a 3 estruturas parciais HC=C.

Figura 12- Espectro de RMN de hidrogênio do composto MDM-1 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Fonte: Autor.

Figura 13- Espectro de carbono 13 do composto MDM-1 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Fonte: Autor.

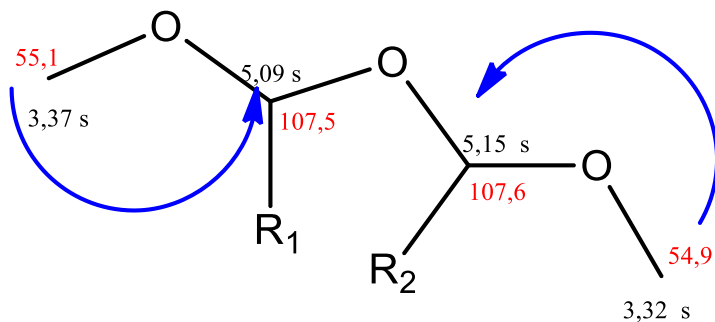
Figura 14 - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN do tipo DEPT do composto MDM-1.

Fonte: Autor.

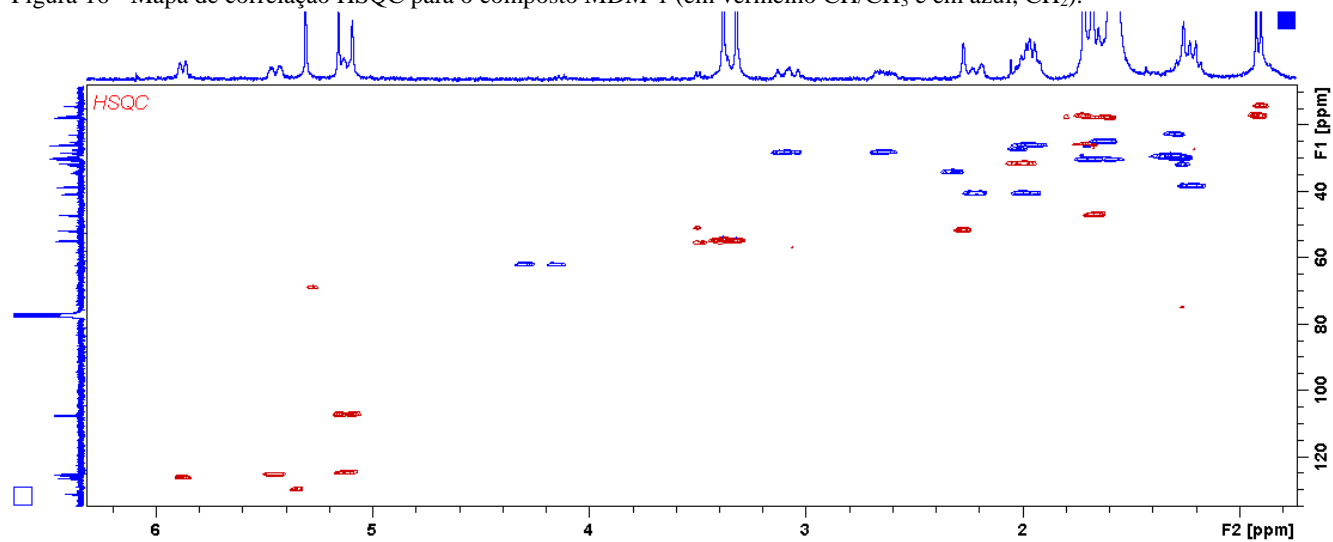
O experimento HSQC permitiu estabelecer a conectividade entre hidrogênios e carbonos, deste modo observou-se a interação entre os hidrogênios em 5,15 ppm e 5,09 ppm ligados a carbonos com deslocamentos em 107,6 ppm e 107,5 ppm, o que sugere a ligação direta destes carbonos a mais de um átomo eletronegativo. Também foram observados os hidrogênios em 3,32 ppm ligados ao carbono em 54,9 e outro hidrogênio em 3,38 (ligado ao carbono em 55,1), sugestivos de metoxila (PAVIA et al. 2015). Tais dados permitem propor uma estrutura parcial correspondente a um diacetil, sendo que as setas em azul mostram a correlação vista no HMBC (Figura 15).

A correlação observada entre o carbono quaternário 146,5 ppm com os hidrogênios em 2,27 ppm e 5,16 ppm, além da correlação entre o carbono em 107,5 ppm e o hidrogênio em 2,27 ppm sugerem a presença de um anel furano na estrutura (figura 18).

Figura 15 - Estrutura parcial de diacetil, proposta a partir das correlações visualizadas no experimento HMBC de MDM-1.

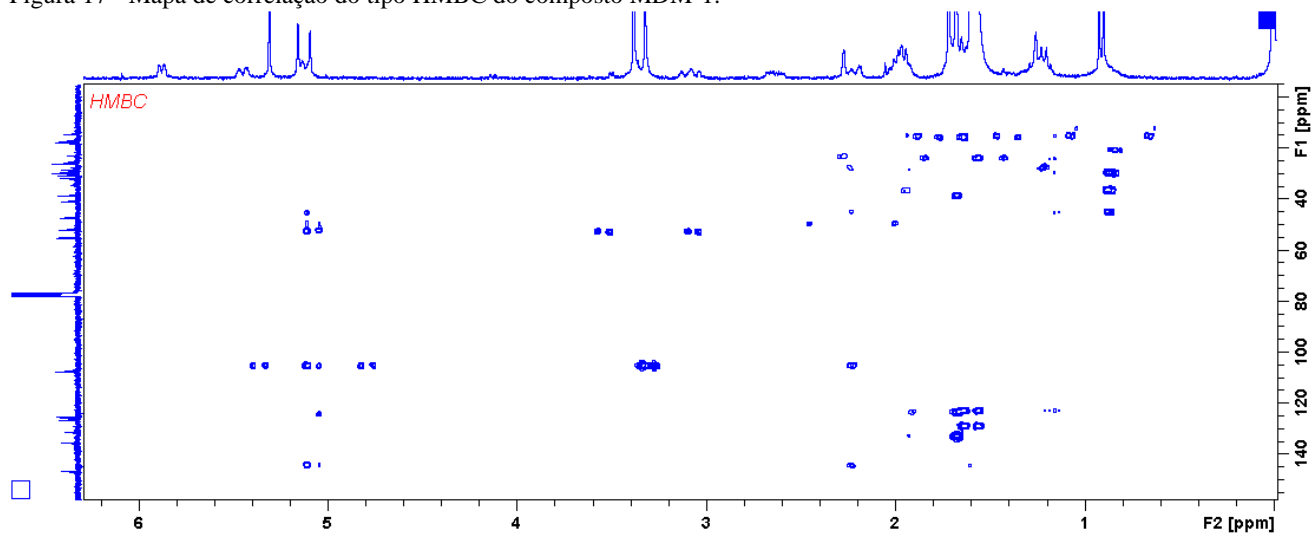


Fonte: Autor.

Figura 16 - Mapa de correlação HSQC para o composto MDM-1 (em vermelho CH/CH<sub>3</sub> e em azul, CH<sub>2</sub>).

Fonte: Autor.

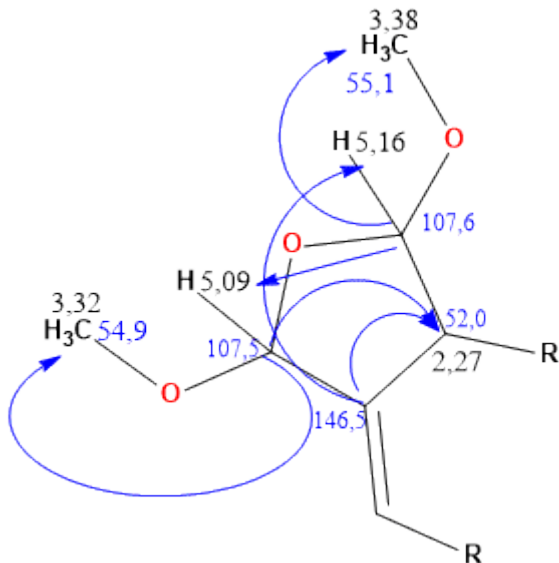
Figura 17 - Mapa de correlação do tipo HMBC do composto MDM-1.



Fonte: Autor.

Pela análise espectral ainda é possível observar a presença de duas metilas vinílicas, com deslocamento em 1,60 ppm e 1,68 ppm, que apresentam correlação no HMBC com o carbono em 131,2 ppm. Na região mais blindada do espectro é possível visualizar os sinais dos hidrogênios de uma metila ressonando como dubleto em 0,91 ppm ( $J = 6,7$  Hz), que pelo HSQC estariam ligados ao carbono em 17,4 ppm. Outras correlações vistas no HMBC foram aquelas entre o carbono em 17,9 ppm e um hidrogênio em 1,95 ppm (multiplete, 1H), e do carbono 26,3 ppm com os hidrogênios da metila em 1,60 ppm. O carbono em 125,3 ppm apresenta correlação com as metilas vinílicas, sugerindo uma estrutura parcial demonstrada na figura 19. A busca de compostos na literatura que apresentassem tal estrutura parcial apontou como melhor “hipótese” um diacetal (Figura 20) cujos dados espectrais são apresentados na tabela 8.

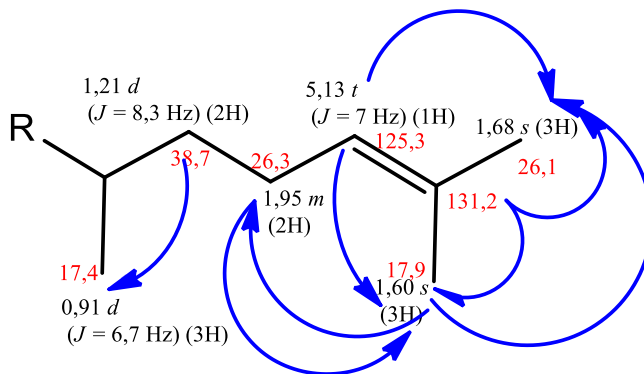
Figura 18 - Estrutura parcial do diacetal, com anel furano, deduzida a partir das correlações observadas no experimento de HMBC para MDM-1.



Fonte: Autor.

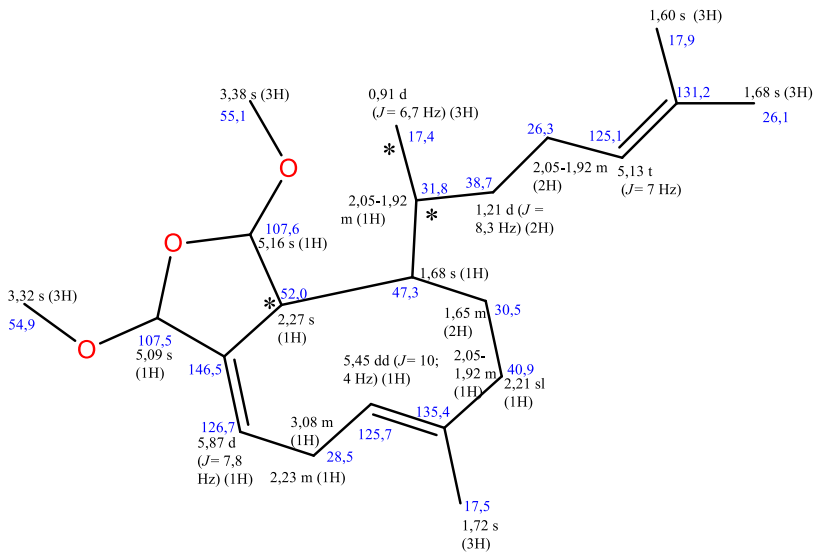


Figura 19 - Terceira estrutura parcial proposta para MDM-1 baseada no HMBC.



Fonte: Autor.

Figura 20 - Estrutura da melhor hipótese encontrada na literatura (Ishitsuka et al., 1982) e considerada compatível com MDM-1.



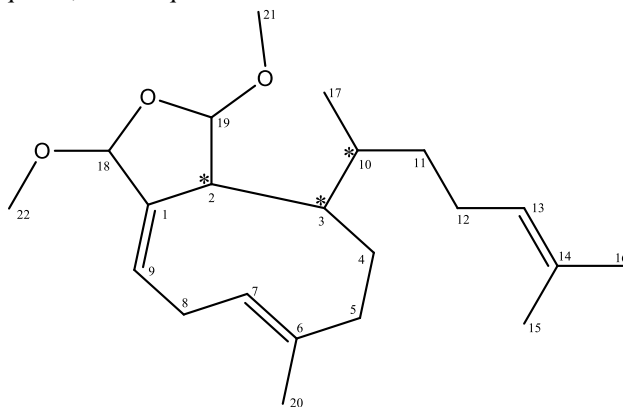
Fonte: Autor.

Tabela 8 - Valores de deslocamentos químicos relatados na literatura para o composto com a estrutura proposta para MDM-1.

Número carbono	Ishtitsuka et al. (1982) (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	MDM-1 (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	
	<sup>1</sup> H (ppm) ( <i>J</i> = Hz) ∫	<sup>13</sup> C (ppm)	<sup>1</sup> H (ppm) ( <i>J</i> = Hz) ∫
1	n.a	146,5	-
2	n.a	52,0	2,27 <i>sl</i> (1H)
3	n.a	47,3	1,68 <i>sl</i> (1H)
4	n.a	40,9	2,21 <i>m</i> (1H) / 2,05-1,92 <i>m</i> (1H)
5	n.a	30,7	1,65 <i>m</i> (2H)
6	n.a	135,4	-
7	5,40 <i>dd</i> ( <i>J</i> = 10;4 Hz) (1H)	125,7	5,44 <i>dd</i> ( <i>J</i> = 10; 4 Hz) (1H)
8	n.a	28,5	3,08 <i>m</i> (1H) / 2,63 <i>m</i> (1H)
9	5,88 <i>dl</i> ( <i>J</i> = 7 Hz) (1H)	126,7	5,87 <i>d</i> ( <i>J</i> = 7,8) (1H)
10	n.a	31,8	2,05-1,92 <i>m</i> (1H)
11	n.a	38,7	1,21 <i>m</i> (2H)
12	n.a	26,3	2,05-1,92 <i>m</i> (2H)
13	5,1 <i>tl</i> ( <i>J</i> = 7 Hz) (1H)	125,3	5,13 <i>t</i> ( <i>J</i> = 7 Hz) (1H)
14	n.a	131,2	-
15	1,61 <i>sl</i> (3H)	17,9	1,60 <i>s</i> (3H)
16	1,69 <i>sl</i> (3H)	26,1	1,68 <i>s</i> (3H)
17	0,93 <i>d</i> ( <i>J</i> = 6 Hz) (3H)	17,4	0,91 <i>d</i> ( <i>J</i> = 6,7 Hz) (3H)
18	5,10 <i>s</i> (1H)	107,5	5,09 <i>s</i> (1H)
19	5,27 <i>sl</i> (1H)	107,6	5,16 <i>s</i> (1H)
20	1,72 <i>sl</i> (3H)	17,5	1,72 <i>s</i> (3H)
21	3,32 <i>s</i> (3H)	54,9	3,32 <i>s</i> (3H)
22	3,47 <i>s</i> (3H)	55,1	3,38 <i>s</i> (3H)

Fonte: Autor.

Figura 21 – Estrutura do diterpeno xeniano MDM-1 com destaque para seus centros quirais, e nome químico da estrutura.



1H ciclona (c) furano, 4 (1,5 dimetil-4-hexenil)- 3,3a,4,5,6,9 - hexahidro-1,3-dimetoxi-7-metil

Fonte: Autor.

A figura 21 destaca os centros quirais apresentados pela estrutura do diterpeno do tipo xeniano isolado como MDM1, além de trazer o nome químico descrito para ela na base de dados *Scifinder*®.

O presente trabalho é o primeiro relato deste composto para *D. mertensii*; o composto originalmente foi isolado da alga parda *Pachydietyon coriaceum* em 1982 por Ishitsuka e colaboradores, sendo descrito por esses autores como diacetal *b*. No ano seguinte, esta substância foi relatada para *Dictyota binghamiae*, e em 1993 para *Dictyota* sp. por Patil e colaboradores, que relataram uma fraca atividade antagonista receptores de vasopressina do tipo V1 (ISHITSUKA et al., 1982; PATHIRANA e ANDERSEN, 1983; PATIL et al., 1993).

Em 1993, Bouaïcha e colaboradores trabalharam com a alga parda *Dilophus ligulatus*, e isolaram o diacetal *b*, para o qual relatam fraca atividade antifúngica frente a cepas das espécies *Aspergillus fumigatus*, *Microsporium canis* e *Trichophyton mentagrophytes*. Os autores ainda relatam uma ótima atividade citotóxica frente às linhagens celulares KB (carcinoma de nasofaringe humana), P388 (leucemia murina) e P388/DOX (leucemia murina com expressão do gene *mdr* – resistência a múltiplos fármacos) com destaque para o resultado obtido para a linhagem NSCLCN6-L16 (carcinoma de pulmão de células não-

pequenas), com  $CI_{50}$  de 0,6  $\mu\text{g/mL}$ , resultado este que foi superior ao controle positivo utilizado, a mercaptopurina.

### 4.3 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DMFN

#### 4.3.1 CLV-DMFN

Foram aplicados 2,5 g do extrato, sendo coletadas 18 frações, que foram analisadas por ressonância magnética nuclear, sendo consideradas interessantes as frações 2, 3, 9, 10, 11, 12.

A fração 2 (48,9 mg) apresentou-se na forma de óleo amarelo, em CCD era possível observar cerca de oito manchas referentes a compostos apolares; o espectro de RMN apresentou sinais característicos de diterpenos, sendo possível identificar as metilas na região de 1 ppm e também diversos sinais na região compreendida entre 5 e 3 ppm, que são característicos de insaturações e hidrogênios próximos ou ligados a átomos eletronegativos (PAVIA et al., 2015).

As frações 9-12 apresentaram perfil semelhante em CCD, e no RMN foram visualizados sinais de aldeídos, que eram diferentes dos deslocamentos apresentados pelos grupos aldeídos da clorofila (KOBAYASHI et al., 2013; PAVIA et al., 2015).

#### 4.3.2 Extração em fase sólida da fração DMFN-2 (FSN-1)

Foram aplicados 46,74 mg, os quais foram separadas em 6 frações, e por semelhança no perfil cromatográfico e rendimento, as frações 2 (5,1 mg) e 3 (12,4 mg) foram reunidas, para separação por cromatografia líquida de alta eficiência.

#### 4.3.3 Coluna sephadex da fração DMFN-12 (SP-12)

Foram aplicados 83,6 mg, os quais foram separadas em 2 frações, sendo que a fração 2 foi escolhida para dar continuidade ao fracionamento, devido ao seu perfil cromatográfico em CCD.

#### 4.3.4 Extração em fase sólida da fração DMFN-11 (FSN-4)

Foram aplicados 75,8 mg, os quais foram separadas em 5 frações, por semelhança no perfil cromatográfico e rendimento, a frações 2 (3,4 mg) e 3 (6,7 mg) foram escolhidas para purificação por cromatografia

líquida de alta eficiência, devido à presença em CCD de compostos que pareciam de interesse.

#### 4.3.5 Extração em fase sólida da fração DMFN-12 (FSN-5)

Foram aplicados 64,0 mg, os quais foram separadas em 7 frações, por semelhança no perfil cromatográfico e rendimento. As frações 2 (7,1 mg) e 3 (7,9 mg) foram consideradas promissoras de acordo com a CCD, para purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

#### 4.3.6 CLAE da fração FSN-1.2

Para a CLAE foram injetados 17,5 mg, sendo coletadas 40 frações; destas, 9 aparentavam estar puras na CCD, sendo denominadas de MFN-1-9. Contudo, quando analisadas por RMN, a fração MFN- 1 (1,82 mg) apresentava sinais de diterpenos, mas nos espectros bidimensionais foi possível observar a degradação da amostra, impossibilitando sua identificação. A amostra MFN-2 apresentou-se em mistura de pelo menos 2 diterpenos, sendo que seus deslocamentos químicos parecem não coincidir com os descritos na literatura para algas do gênero, não sendo possível concluir nada a respeito das suas estruturas. As amostras MFN-4-9 pareceram tratar-se de graxas, portanto desinteressantes para maior investimento na identificação. Na tabela 9, é apresentado o rendimento das frações obtidas.

Tabela 9 - Rendimentos das frações da CLAE FSN-1.

Fração	Rendimento (mg)
MFN-1	1,82
MFN-2	1,44
MFN-3	2,18
MFN-4	0,78
MFN-5	0,51
MFN-6	0,36
MFN-7	0,69
MFN-8	0,85
MFN-9	0,18

Fonte: Autor.

#### 4.3.6.1 Identificação estrutural do composto MFN-3

A fração MFN-3 (2,18 mg) apresentou-se cromatograficamente pura em CCD, como uma substância de cor roxa, após revelação com anisaldeído sulfúrico, apresentando  $R_f$  0,29 em cHex: AcOEt (98,5:1,5).

Foram obtidos os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 22),  $^{13}\text{C}$  (Figura 23), além dos bidimensionais HSQC (Figura 24), HMBC (Figura 25) e COSY (Figura 26). Na tabela 10, são apresentados os valores de deslocamentos químicos observados nos espectros de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , bem como suas correlações de acordo com o HSQC.

O espectro de  $^1\text{H}$  apresentou sinais na região de 5 ppm, sendo eles um singlete largo em 5,33 (1H) e duplo duplete em 5,12 ppm (1H,  $J = 7,3$ ; 7 Hz), sugestivos de metinos. O sinal em 4,75 ppm apresentou-se como um singlete largo (2H), que apresentava correlação no HSQC com o carbono em 107,1 ppm, sugerindo tratar-se de um metileno exocíclico. Em 3,92 ppm é possível identificar um duplo duplete (1H,  $J = 5,2$ ; 4,7 Hz), com correlação no HSQC com o carbono em 75,1, sugerindo tratar-se de um hidrogênio ligado a um carbono ao qual poderia estar ligado um grupamento hidroxila. Na região mais blindada do espectro, é possível observar a presença de sinais integrando para 3H, correspondentes a duas metilas vinílicas em 1,69 ppm e 1,61 ppm, e uma terceira metila em 1,00 (d,  $J = 5,6$  Hz) (PAVIA et al., 2015).

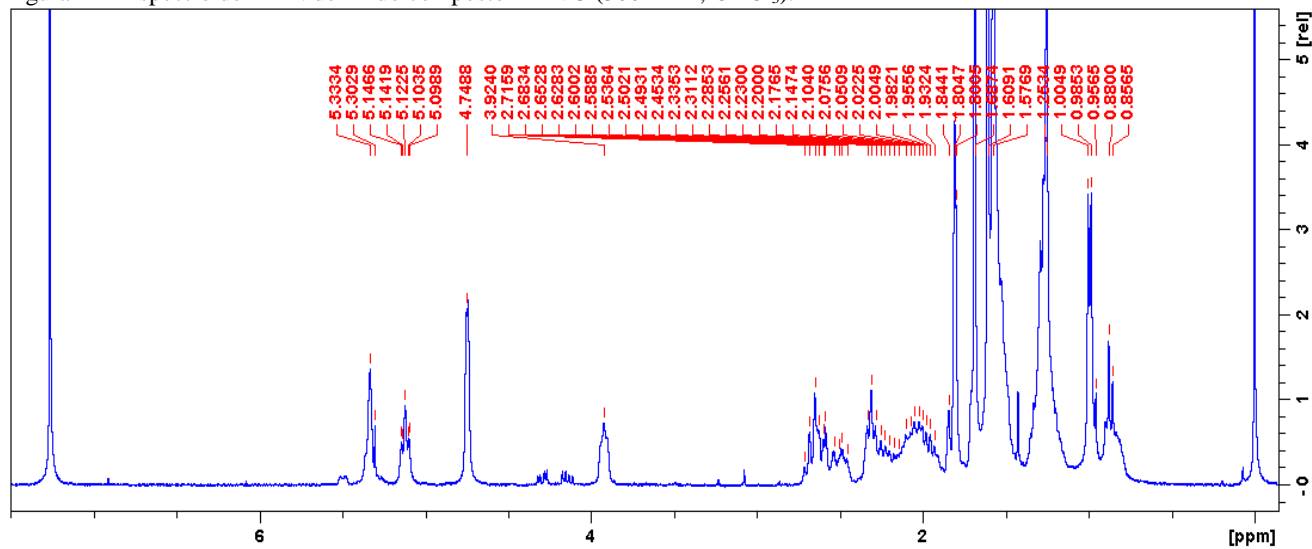
A análise do mapa de correlação HMBC permitiu estabelecer a conectividade de algumas estruturas parciais. A primeira estrutura parcial (Figura 27) foi deduzida a partir da correlação entre os carbonos que ressonam em 46,0 ppm e 40,6 ppm com os hidrogênios em 4,75 ppm; do carbono em 60,4 ppm com os hidrogênios da metila em 1,81 ppm e com o metino em 5,33 ppm. Outra correlação importante para a determinação da estrutura foi observada entre o carbono 33,8 ppm com os hidrogênios em 2,68 ppm e 5,33 ppm. Com base nessas observações, foi possível concluir que se tratava de um diterpeno prenilado (VALLIM et al., 2005).

Tabela 10 - Valores de deslocamentos químicos de carbonos do composto MFN-3 e suas correlações com hidrogênios a partir do experimento HSQC.

*MFN-3 (300 MHz) (CDCl<sub>3</sub>)*

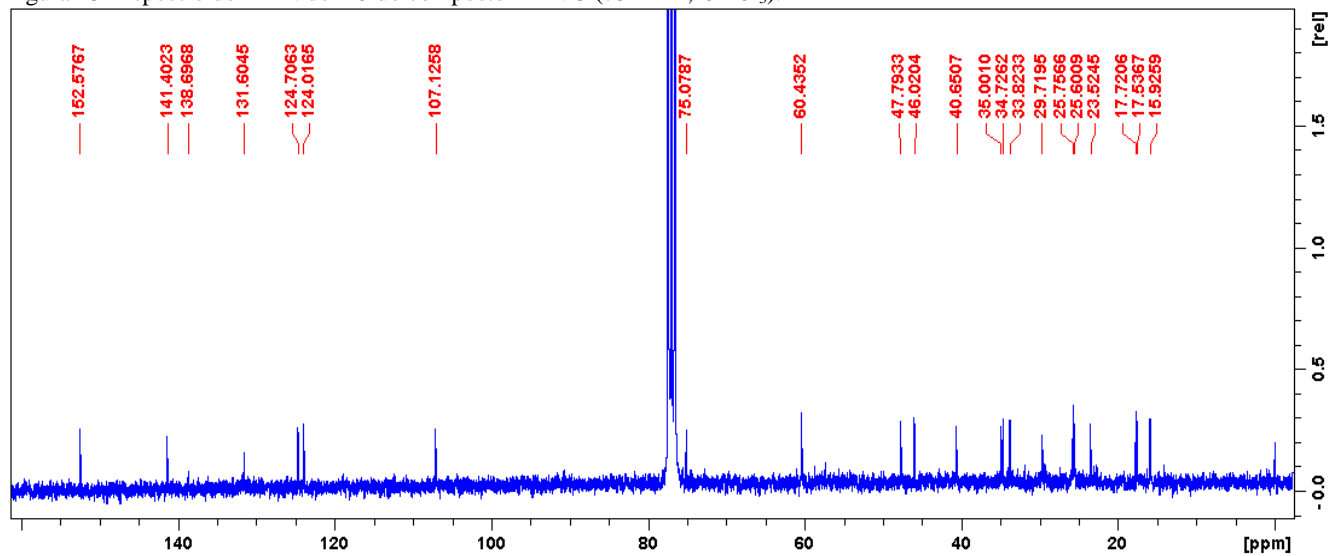
<i>Número carbono</i>	<sup>13</sup> C (ppm)	<sup>1</sup> H (ppm) ( <i>J</i> = Hz)∫
1	46,0	2,68 <i>m</i> (1H)
2	33,8	2,23 <i>m</i> (1H) 2,54 <i>m</i> (1H)
3	124,0	5,33 <i>sl</i> (1H)
4	141,4	-
5	60,4	2,34 <i>m</i> (1H)
6	75,1	3,92 <i>dd</i> (1H, <i>J</i> = 5,2; 4,7 Hz)
7	47,8	1,57 <i>sl</i> (1H)
8	23,5	1,52 <i>m</i> (2H)
9	40,6	2,62 <i>m</i> (1H) 2,15 <i>m</i> (1H)
10	152,6	-
11	34,7	1,57 <i>sl</i> (1H)
12	35,0	1,25 <i>sl</i> (2H)
13	25,7	2,02 <i>m</i> (2H)
14	124,7	5,12 <i>dd</i> (1H, <i>J</i> = 7,3; 7)
15	131,6	-
16	25,6	1,69 <i>s</i> (3H)
17	15,9	1,81 <i>sl</i> (3H)
18	107,1	4,75 <i>sl</i> (2H)
19	17,7	1,00 <i>d</i> (3H, <i>J</i> = 5,6)
20	17,5	1,61 <i>s</i> (3H)

Fonte: Autor.

Figura 22 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto MFN-3 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

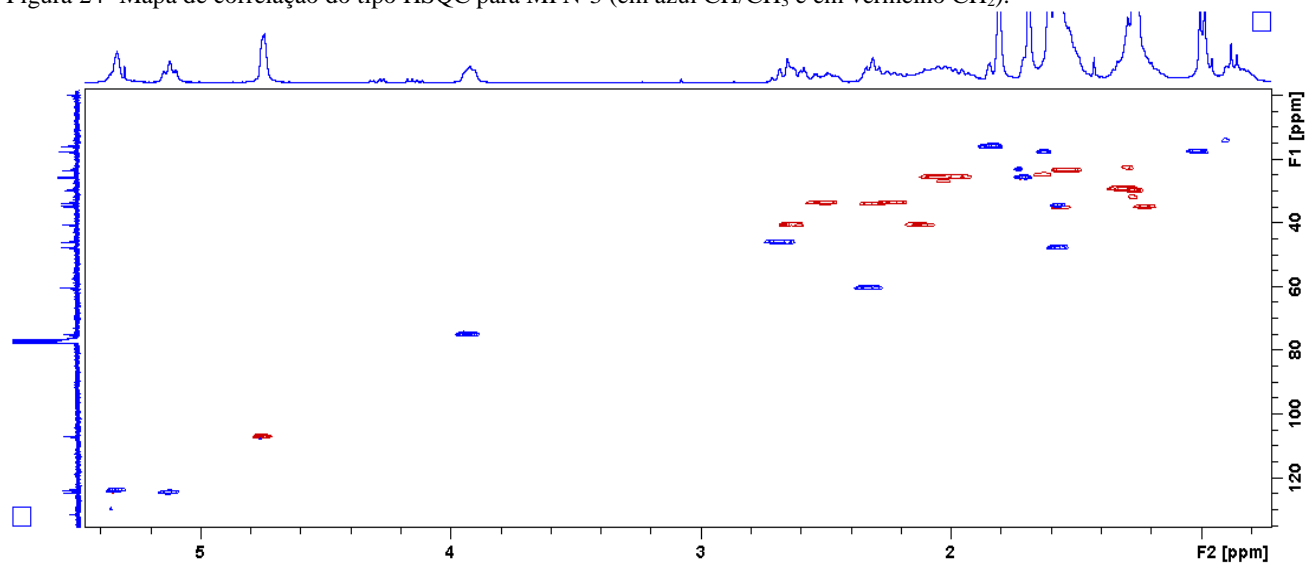
Fonte: Autor.



Figura 23- Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto MFN-3 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

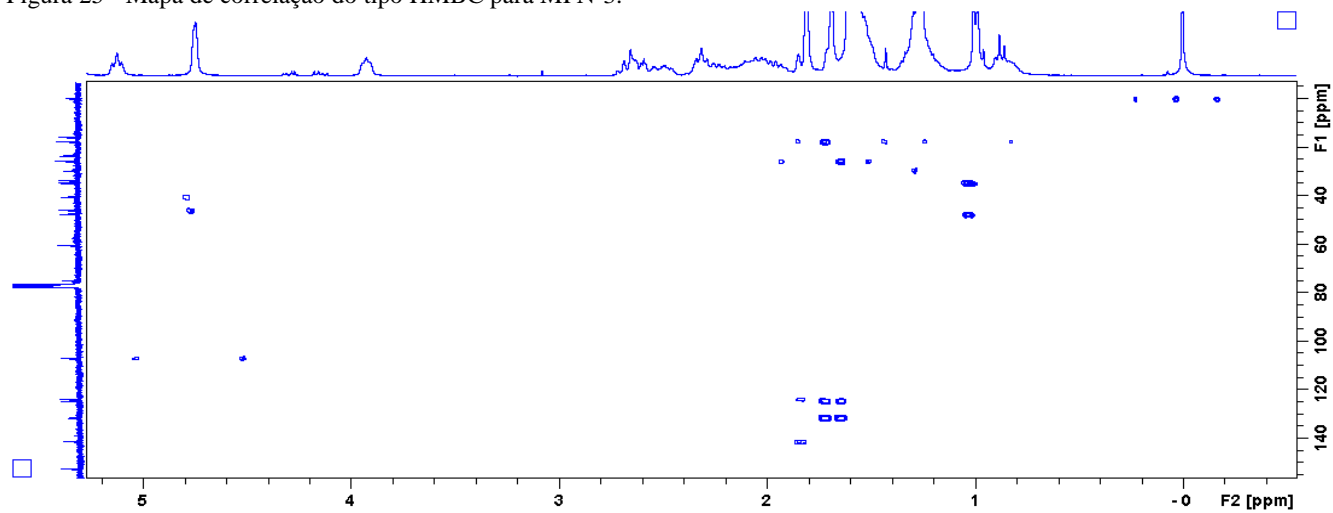
Fonte: Autor.

Figura 24- Mapa de correlação do tipo HSQC para MFN-3 (em azul CH/CH<sub>3</sub> e em vermelho CH<sub>2</sub>).



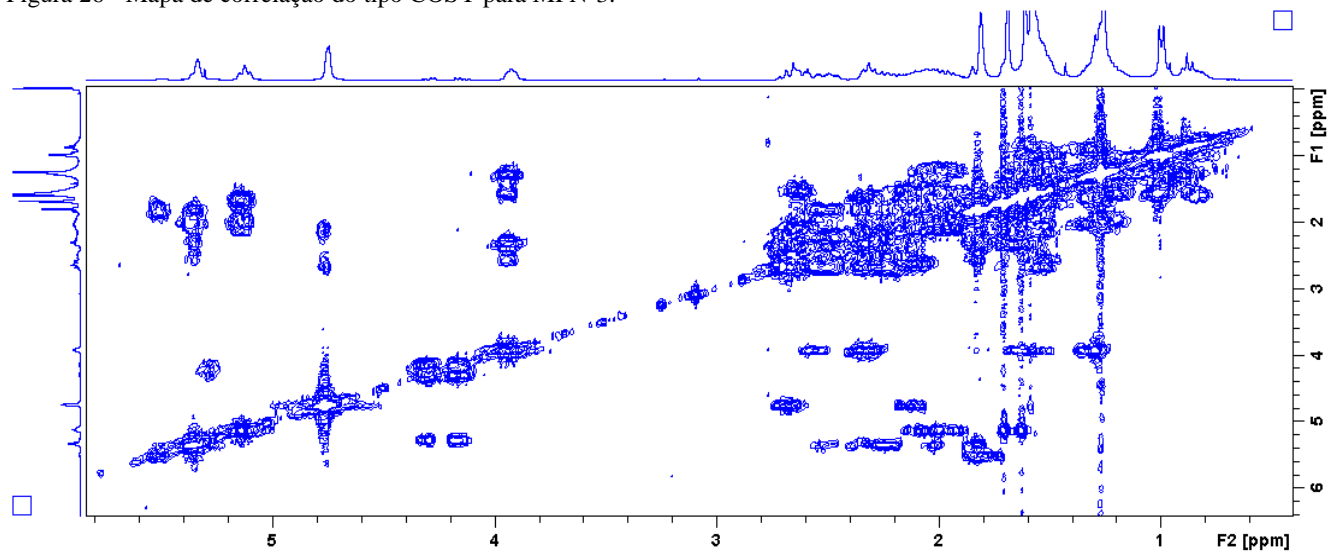
Fonte: Autor.

Figura 25 - Mapa de correlação do tipo HMBC para MFN-3.



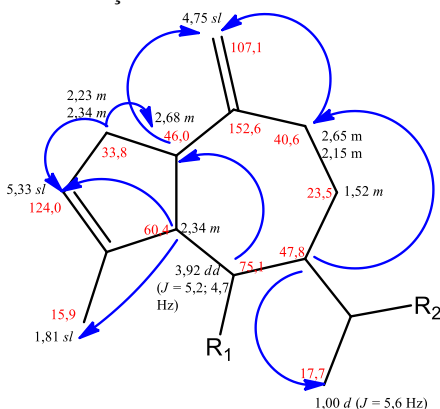
Fonte: Autor.

Figura 26 - Mapa de correlação do tipo COSY para MFN-3.



Fonte: Autor.

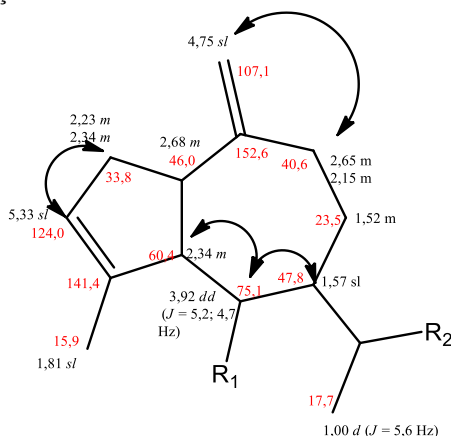
Figura 27- Primeira estrutura parcial do composto MFN-3, com representação das correlações do HMBC.



Fonte: Autor.

As correlações observadas no experimento de COSY (Figura 26) dos hidrogênios em 4,75 ppm com os hidrogênios em 2,65 ppm e 2,15 ppm, além das correlações do hidrogênio em 3,92 ppm com os hidrogênios em 2,34 ppm e 1,57 ppm; e entre o hidrogênio oléfinico em 5,33 ppm com os hidrogênios em 2,23 ppm e 2,34 ppm são destacadas na figura 28e reforçam a hipótese inicial de MFN-3 ser um guaiano-prenilado.

Figura 28- Primeira estrutura parcial do composto MFN-3, destacando as correlações observadas no COSY.

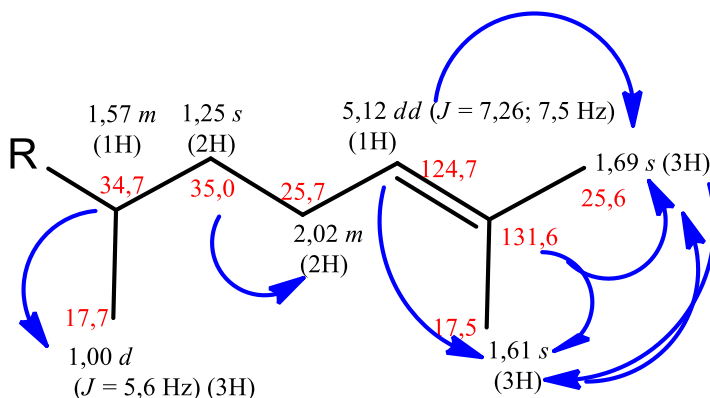


Fonte: Autor.

As correlações observadas no HMBC e HSQC permitiram a proposição de uma cadeia vinílica muito característica de diterpenos encontrados na espécie. A figura 29 destaca as correlações observadas no experimento de HMBC entre o carbono 124,7 ppm e as metilas em 1,69 ppm e 1,61 ppm, as quais também apresentam correlação com o carbono quaternário em 131,6 ppm. Ainda é possível observar as correlações entre o carbono em 34,7 ppm e a metila em 1,00 ppm, bem como entre o carbono em 35,0 ppm e o hidrogênio em 2,02 ppm.

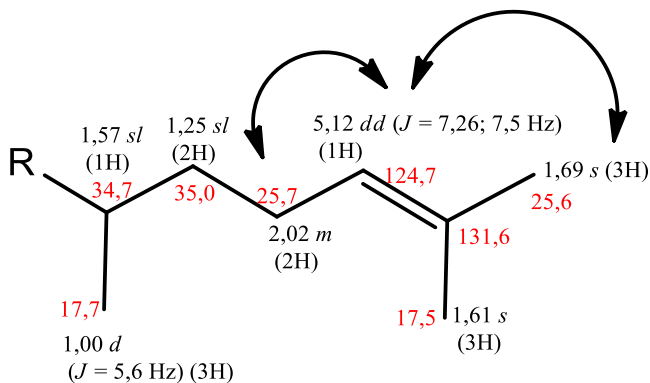
As correlações entre o hidrogênio olefínico em 5,12 ppm e os hidrogênios em 1,69 ppm e 2,02 ppm observadas no COSY ajudaram na confirmação de posição destes hidrogênios na estrutura, conforme é demonstrado na figura 30.

Figura 29 - Segunda estrutura parcial do composto MFN-3, destacando as correlações observadas no mapa de correlação HMBC.



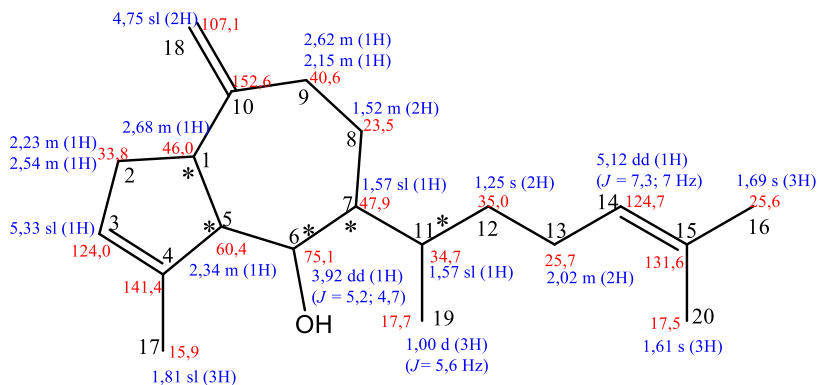
Fonte: Autor.

Figura 30 - Segunda estrutura parcial do composto MFN-3, destacando as correlações observadas no mapa de correlação COSY.



Fonte: Autor.

Figura 31 – Estrutura final proposta para o composto MFN-3, a partir do conjunto de dados de RMN.



Fonte: Autor.

A estrutura proposta para MFN-3 (Figura 31) corresponde ao pachidictyol A, que já foi isolado anteriormente da *D. mertensii* por Alvarado e Gerwick (1985), posteriormente por Freitas e colaboradores (2007). Contudo, o primeiro relato de isolamento foi a partir da alga parda *Pachydictyon coriaceum* em 1973, por Hirschfeld e colaboradores. A tabela 11 apresenta os deslocamentos químicos no espectro RMN de  $^1\text{H}$  obtidos para o composto isolado no presente trabalho e no relato original.

Para o composto pachidictyol A, já foram descritas atividades biológicas. No estudo de Ayyad e colaboradores (2003), em que foi estudada a alga parda *Cytoseira myrica*, avaliou-se a citotoxicidade do composto frente à linhagem de fibroblastos de ratos NIH3T3, que representam as células saudáveis no estudo, e às linhagens KAT3IT e SSVNIH3T3, que foram modificadas por ação viral, tornando-se tumorais. O composto mostrou-se citotóxico para todas as linhagens, inibindo seu crescimento, o que demonstra potencial toxicidade para células normais.

Em 2011, Ayyad e colaboradores publicam mais um estudo com avaliação do potencial citotóxico e de danos ao DNA celular causado pelo composto pachidictyol A, isolado desta vez da alga parda *Dictyota dichotoma*, sendo testado frente às linhagens de hepatoma HEPG2, câncer de mama MCF-7, e à linhagem celular VERO (de rins de macacos selvagens africanos). Como linhagem normal, foi usada como controle a linhagem de fibroblastos WI-38 e os resultados comprovam a citotoxicidade do composto.

A atividade anti-herbivoria também é relatada para o composto. Em todos os estudos realizados com peixes, foi observada a inibição do consumo da alga produtora. Entretanto, os estudos mostraram que o consumo por ouriços, como *Diadema antillarum*, não é afetado pela presença do composto, e que, por outro lado, levou a um aumento do consumo por anfípodos (HAY; FENICAL; GUSTAFSON, 1987). Em 1996, Hay e Fenical comprovaram que algas produtoras de pachidictyol A são pouco consumidas por peixes e que o composto preservaria, assim, a morada de anfípodos do tipo *Pseudamphithoide*. Tais estudos mostram a importância do composto para ecologia química do ambiente que a alga está inserida, levando a um consumo seletivo de espécies.



Tabela 11 - Comparação entre os deslocamentos químicos de RMN de hidrogênio obtidos para MNF-3 e os relatados na literatura para o pachidictyol A isolado originalmente.

	<i>Hirschfeld et al.</i> (1973)	<i>MFN-3 (300 MHz)</i> ( $CDCl_3$ )
<b>Número carbono</b>	<b><math>^1H</math> (ppm) (<math>J = Hz</math>)</b>	
1	n.a	2,68 <i>m</i> (1H)
2	n.a	2,23 <i>m</i> (1H) 2,54 <i>m</i> (1H)
3	5,30 <i>m</i> (1H)	5,33 <i>sl</i> (1H)
4	n.a	-
5	n.a	2,34 <i>m</i> (1H)
6	3,85 <i>sl</i> (1H)	3,92 <i>dd</i> (1H, $J = 5,2;$ 4,7 Hz)
7	n.a	1,57 <i>sl</i> (1H)
8	n.a	1,52 <i>m</i> (2H)
9	n.a	2,62 <i>m</i> (1H) 2,15 <i>m</i> (1H)
10	n.a	-
11	n.a	1,57 <i>sl</i> (1H)
12	n.a	1,25 <i>sl</i> (2H)
13	n.a	2,02 <i>m</i> (2H)
14	5,10 <i>t</i> (1H)	5,12 <i>dd</i> (1H, $J = 7,3;$ 7 Hz)
15	n.a	-
16	1,60 <i>s</i> (3H)	1,69 <sub>s</sub> (3H)
17	1,75 <i>s</i> (3H)	1,81 <i>sl</i> (3H)
18	4,72 <i>s</i> (2H)	4,75 <i>sl</i> (2H)
19	0,97 <i>d</i> (3H)	1,00 <i>d</i> (3H, $J = 5,6$ )
20	1,67 <i>s</i> (3H)	1,61 <i>s</i> (3H)

Fonte: Autor.

### 4.3.7 CLAE das frações FSN 4.3 e 5.3

Como resultado da CLAE da fração FSN-4.3 obtiveram-se 16 frações, das quais cinco eram puras, mas com baixo rendimento (tabela 12). Destaca-se a amostra MFN-11, a qual, por RMN, foi possível sugerir que se trataria de um dialdeído.

As amostras MFN-23 e MFN-24 são hidrocarbonetos insaturados. As demais frações isoladas (MFN-22 e 25) não tiveram sua identificação possível, devido ao baixo rendimento apresentado.

A partir da CLAE da fração FSN-5.3 obtiveram-se 10 frações, das quais sete eram compostos aparentemente puros em CCD, sendo que a amostra MFN-20, quando analisada por RMN, mostrou-se igual ao composto MFN-11. O composto MFN-21 tratava-se de um ftalato, enquanto os compostos MNF-16 ao 19 são hidrocarbonetos.

Tabela 12 - Rendimentos das frações puras obtidas da CLAE das frações FSN-4.3 e FSN-5.3.

Fração	Rendimento (mg)
MFN-11	1,08
MFN-20	1,05
MFN-16	0,20
MFN-17	0,34
MFN-18	0,30
MFN-19	0,51
MFN-21	1,98
MFN-32	1,01
MFN-22	0,19
MFN-23	0,37
MFN-24	0,38
MFN-25	0,12

Fonte: Autor.

#### 4.3.7.1 Identificação estrutural do composto MFN-11

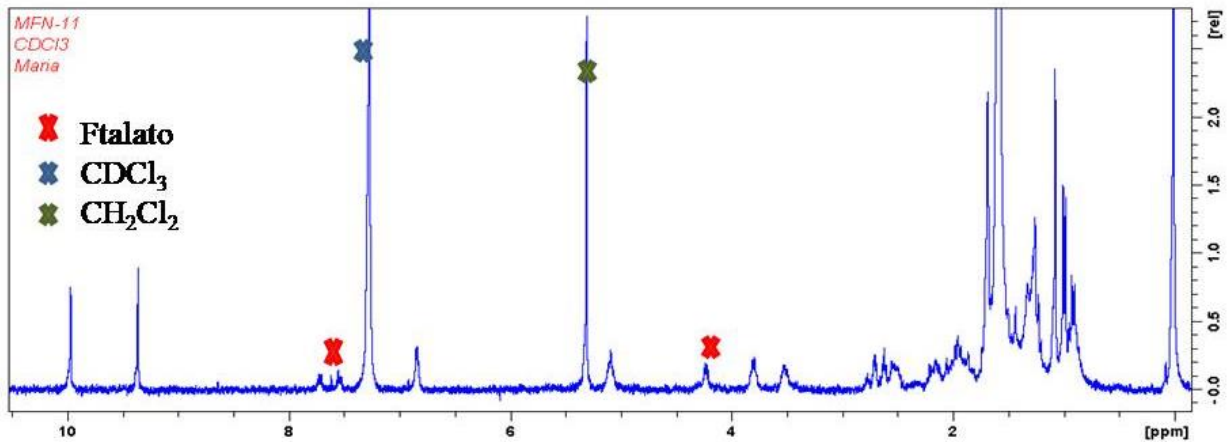
O composto isolado a partir da CLAE das frações FSN 3 e FSN 4 foi denominado MFN-11; em CCD, após revelação com anisaldeído-sulfúrico, apresentou coloração avermelhada, com Rf 0,1 em fase móvel cHex: AcEOt (7:3).

Quando analisado em RMN, pareceu tratar-se de um dialdeído (pela presença de dois sinais acima de 9 ppm), sendo o espectro apresentado na figura 32, suas ampliações nas figuras 33 e 34. A tabela 13 mostra os valores encontrados para os deslocamentos de  $^1\text{H}$  RMN. Entretanto, durante o processo de obtenção dos espectros para a identificação e elucidação estrutural, ocorreu a degradação do composto, o que é demonstrado na figura 35.

Tabela 13 - Valores de deslocamentos químicos de  $^1\text{H}$  RMN para o composto MFN-11.

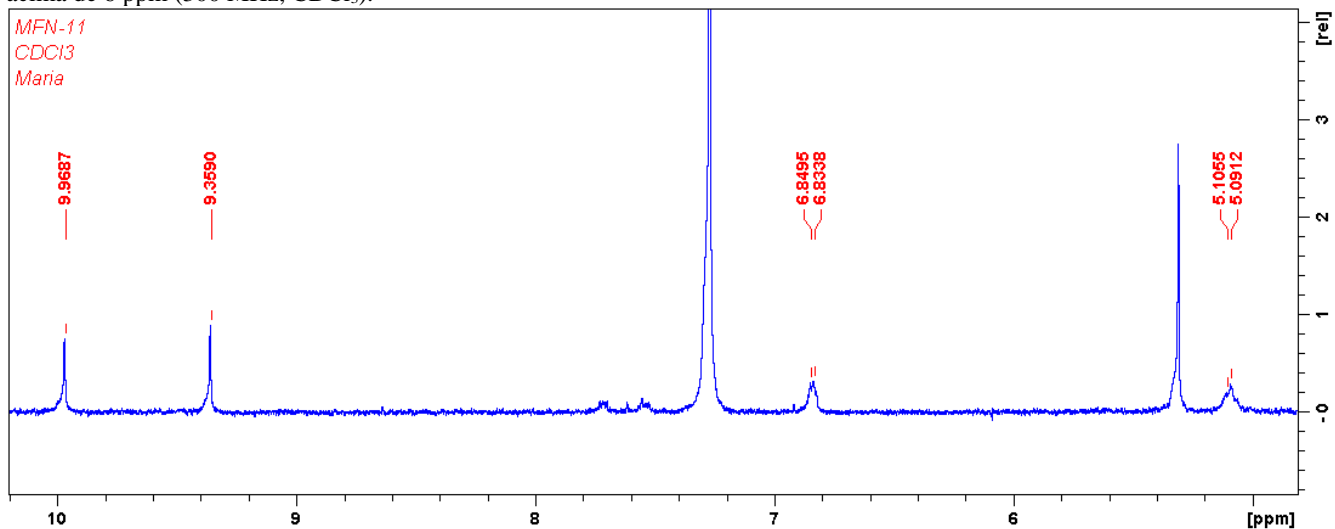
$^1\text{H}$ (ppm) ( <i>f</i> , <i>J</i> = Hz)
9,97 <i>s</i> (1H)
9,36 <i>s</i> (1H)
6,84 <i>dd</i> (1H, <i>J</i> = 4,9; 2,7)
5,31 <i>s</i>
5,10 <i>m</i>
3,79
3,5 <i>sl</i>
2,7 <i>m</i>
2,60 <i>m</i>
2,50 <i>m</i> (2H)
2,15 <i>m</i> (6H)
1,92 <i>m</i>
1,68 <i>s</i> (6H)
1,43 (1H)
1,30 <i>m</i>
1,07 (3H)
0,99 <i>d</i> (3H, <i>J</i> = 7)

Fonte: Autor.

Figura 32- Aspecto geral do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto MFN-11 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

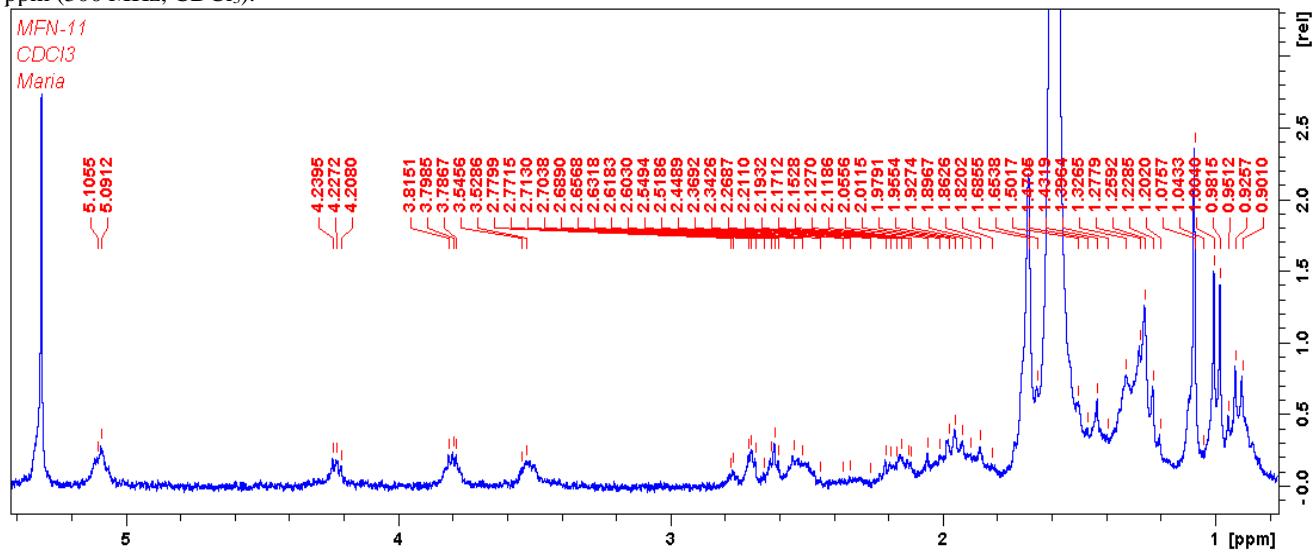
Fonte: Autor.

Figura 33 - Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto MFN-11, com marcação dos deslocamentos químicos na região acima de 6 ppm (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Fonte: Autor.

Figura 34- Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto MFN-11, com marcação dos deslocamentos na região abaixo de 5 ppm (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Fonte: Autor.

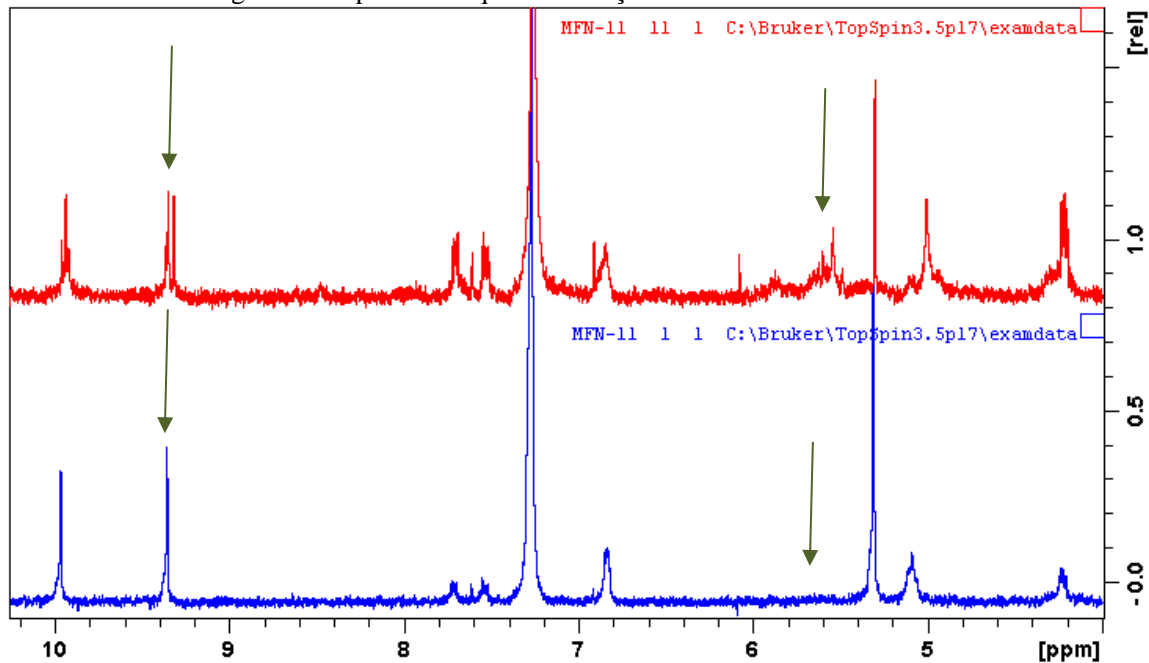
A presença do dialdeído é sugerida pela presença dos sinais em 9,97 ppm e 9,36 ppm. Comparando os dados obtidos no RMN  $^1\text{H}$  com os dados da revisão de literatura, considerou-se a possibilidade de se tratar de um composto novo, pois o sinal com deslocamento em 9,97 ppm é diferente dos encontrados para os dialdeídos já descritos para o gênero, como demonstrado na tabela 14. Entretanto, por ocasião da obtenção dos experimentos bidimensionais, o composto pareceu ter-se degradado, uma vez que sinais adicionais foram visualizados no espectro de hidrogênio (Figura 35).

Tabela 14 - Comparação entre os deslocamentos químicos dos  $^1\text{H}$  aldeídicos já descritos na literatura para o gênero e para MFN-11.

<i>Autor (ano)</i>	<i>Deslocamento dos H aldeídicos <math>^1\text{H}</math> RMN (ppm)</i>	<i>Nome do composto</i>
<i>Finer et al (1979)</i>	9,33 / 10,20	Dictyodial
<i>Ravi (1982)</i>	9,25 / 10,10	Dictyodial
<i>Siamopoulou et al (2004)</i>	9,27 / 10,16	4 $\alpha$ -acetildictyodial
<i>Tanaka e Higa (1984)</i>	9,37 / 9,70	4 $\beta$ -hidroxidictyodial
<i>Blount et al (1982)</i>	9,38 / 9,67	6-hidroxidichotoma-3,14-dieno-1,17-dial
<i>Autor</i>	<b>9,36 / 9,97</b>	<b>MFN-11</b>

Fonte: Autor.

Figura 35 - Espectros de  $^1\text{H}$  RMN do composto MFN-11 antes (azul) e após (vermelho) a degradação da amostra. As setas destacam as regiões do espectro em que as alterações são mais evidentes.



Fonte: Autor.



#### 4.4 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os ensaios de citotoxicidade realizados preliminarmente utilizaram células da linhagem de câncer de cólon do tipo HCT-116 (Tabela 15). Os resultados obtidos mostraram que o extrato bruto DMFN ( $CI_{50} = 4,95 \mu\text{g/mL}$ ), as frações DMFN-3 ( $CI_{50} = 4,1 \mu\text{g/mL}$ ) e DMFN-11 ( $CI_{50} = 5,66 \mu\text{g/mL}$ ) tiveram uma atividade moderada, pois apresentaram  $IC_{50}$  menor ou igual a  $5 \mu\text{g/mL}$ . Contudo o extrato bruto DMJT ( $CI_{50} = 1,19 \mu\text{g/mL}$ ), a fração DMFN-10 ( $CI_{50} = 0,45 \mu\text{g/mL}$ ) e os compostos isolados MFN-3 ( $CI_{50} = 0,51 \mu\text{g/mL}$ ) e MDM-1 ( $CI_{50} = 0,33 \mu\text{g/mL}$ ) foram considerados fortemente citotóxicos. O gráfico 1 mostra os resultados para a avaliação preliminar.

Tabela 15- Concentrações inibitórias médias ( $CI_{50}$ ) de amostras testadas no âmbito do presente trabalho para citotoxicidade frente a HCT-116.

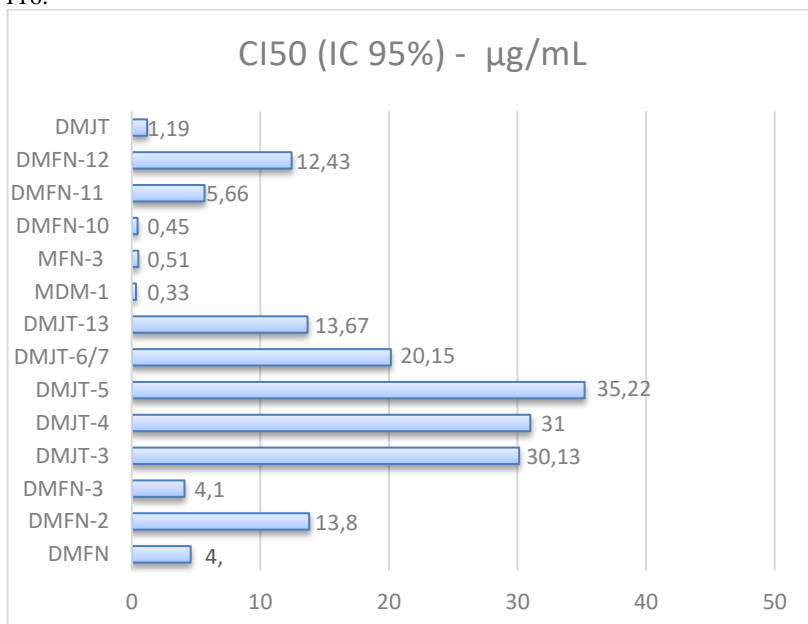
Amostras	$CI_{50}$ ( IC 95%) - $\mu\text{G/ML}$
<b>DMFN</b>	<b>4,58 (24,04 a 26,9)</b>
DMFN-2	13,80 (6,91 a 27,56)
<b>DMFN-3</b>	<b>4,1 (2,71 a 6,34)</b>
<b>DMJT</b>	<b>1,19 (0,96 a 1,4)</b>
DMJT-3	30,13 (27,44 a 33,09)
DMJT-4	31,0 (28,9 a 33,25)
DMJT-5	35,22 (31,8 a 38,9)
DMJT-6/7	20,15 (17,75 a 22,08)
DMJT-13	13,67 (8,78 a 21,26)
<b>MDM 1</b>	<b>0,33 (0,16 a 0,67)</b>
<b>MFN-3</b>	<b>0,51 (0,23 a 1,14)</b>
<b>DMFN-10</b>	<b>0,45 (0,24 a 0,85)</b>
<b>DMFN-11</b>	<b>5,66 (5,52 a 5,81)</b>
DMFN-12	12,43 (5,52 a 5,81)

$CI_{50}$  : Concentração inibitória média em  $\mu\text{g/mL}$ .

**IC95%**: Intervalo de confiança de 95%

Fonte: Autor.

Gráfico 1 - Resultados da atividade citotóxica de extratos, frações e compostos obtidos nesta dissertação, frente a células de carcinoma de colón humano HCT-116.



Fonte: Autor.

A tabela 16 apresenta os resultados dos testes de atividade citotóxica para as diferentes linhagens B16-F10, PC3-M, 293A, além de destacar os resultados obtidos pelos compostos promissores frente a linhagem HCT-116.

O extrato bruto DMFN, que havia apresentado uma atividade moderada nos testes iniciais com a linhagem celular HCT-116 (4,58 µg/mL), demonstrou menor atividade contra as outras linhagens B16-F10 (26,62 µg/mL), PC3-M (19,94 µg/mL), 293A (13,58 µg/mL), indicando certa seletividade.

As frações da CLV, DMFN-3, DMFN-10, DMFN-11 se mostraram muito promissoras, sendo que para a linhagem B16-F10 os resultados de concentração inibitória foram, respectivamente, 1,74 µg/mL; 1,70 µg/mL e 5,33 µg/mL. Entretanto, durante o processo de fracionamento da fração 3, ocorreu degradação dos metabólitos, impossibilitando a identificação dos possíveis responsáveis pela atividade.

Para a linhagem celular PC3-M, as toxicidades das frações testadas foram moderadas, com valores de  $CI_{50}$  entre 2,23  $\mu\text{g/mL}$  (DMFN-3) e 6,39  $\mu\text{g/mL}$  (DMFN-11). Já para a linhagem 239A, as frações DMFN-3 e DMFN-10 se mostraram fortemente citotóxicas para células ( $CI_{50}$  de 0,35  $\mu\text{g/mL}$  e 0,17  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), enquanto a fração DMFN-11 apresentou valor de  $CI_{50}$  de 2,87  $\mu\text{g/mL}$ .

O composto isolado MDM1 apresentou uma ótima taxa de inibição para todas as linhagens, contudo foi muito ativo contra a linhagem 293A (1,86  $\mu\text{g/mL}$ ), o que demonstra alto potencial de toxicidade para células normais. Este composto mostrou certa seletividade para HCT-116, pois apesar de ter boas taxas de inibição para as linhagens B16-F10 (4,03  $\mu\text{g/mL}$ ) e PC3-M (5,8  $\mu\text{g/mL}$ ), elas foram bem menores para aquela linhagem (0,33  $\mu\text{g/mL}$ ).

O composto pachidictyol A (MFN-3) apresentou atividade moderada contra as linhagens B16-F10 (2,89  $\mu\text{g/mL}$ ), e PC3-M (4,72  $\mu\text{g/mL}$ ), mas foi altamente citotóxico contra as linhagens HCT-116 (0,23  $\mu\text{g/mL}$ ) e 239A (0,47  $\mu\text{g/mL}$ ). Novamente, o resultado apresentado para esta última linhagem alerta para a toxicidade frente a células normais. Assim, tanto para MDM1, como para MFN-3, seria interessante considerar estratégias de modelagem molecular para aumentar a seletividade para linhagens de células tumorais.

Quando comparados os resultados com o padrão positivo de doxorubicina utilizado no experimento, observa-se que apesar da citotoxicidade apresentada pelos compostos pachidictyol A e MDM-1 frente à linhagem celular normal de células de rim embrionário 239A, eles ainda são menos tóxicos para estas células do que o controle positivo. Tal resultado é interessante, pois abre a possibilidade de que poderiam causar menos efeitos colaterais que a doxorubicina. Destaca-se ainda o fato de que a concentração inibitória média do composto MDM-1 para a linhagem HCT-116 assemelha-se à da doxorubicina.

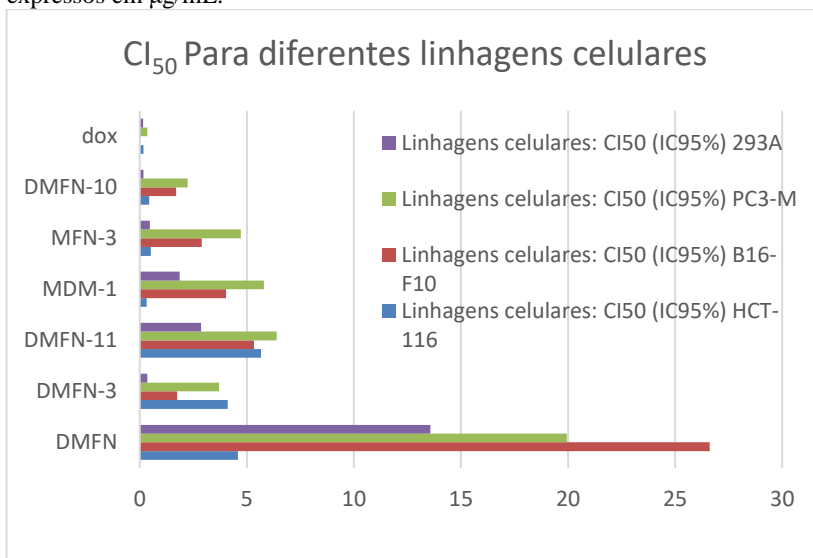
Tabela 16 - Resultados de inibição da proliferação celular para diferentes linhagens celulares (HCT-116; B16-F10; PC3-M; 293A).

Amostras	Linhagens celulares: CI <sub>50</sub> (IC95%)			
	HCT-116	B16-F10	PC3-M	293 <sup>a</sup>
DMFN	4,58 (24,04 a 26,9)	26,62 (24,89 a 28,47)	19,94 (17,63 a 22,55)	13,58 (9,78 a 18,83)
DMFN-3	4,1 (2,71 a 6,34)	1,74 (0,39 a 7,74)	3,71 (2,73 a 5,05)	0,35 (0,14 a 0,87)
DMFN-11	5,66 (5,52 a 5,81)	5,33 (4,96 a 5,75)	6,39 (5,93 a 6,89)	2,87 (2,34 a 3,30)
MDM-1	0,33 (0,16 a 0,67)	4,03 (0,37 a 43,95)	5,80 (2,97 a 10,11)	1,86 (0,49 a 7,0)
MFN-3	0,51 (0,23 a 1,14)	2,89 (0,92 a 9,07)	4,72 (3,37 a 6,61)	0,47 (0,85 a 5,26)
DMFN-10	0,45 (0,24 a 0,85)	1,70 (1,08 a 2,68)	2,23 (1,55 a 3,21)	0,17 (0,04 a 0,69)
Doxorrubicina	0,17 (0,13 a 0,21)	0,03 (0,02 a 0,04)	0,36 (0,17 a 0,78)	0,16 (0,13 a 0,22)

Fonte: Autor.

Pelo gráfico 2, é possível observar a diferença entre os valores de CI<sub>50</sub> de cada amostra frente às diferentes linhagens celulares.

Gráfico 2- Concentração inibitória média (CI<sub>50</sub>) para diferentes linhagens celulares das amostras que foram ativas contra a linhagem HCT-116. Valores expressos em µg/mL.



Fonte: Autor.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

Este trabalho de dissertação foi o segundo realizado neste Programa de Pós-graduação com a espécie *Dictyota mertensii*, sendo a primeira dissertação envolvendo a mesma espécie de duas ilhas distintas. Foi também o segundo trabalho acadêmico concluído pelo grupo de pesquisa envolvendo algas pardas.

Em relação à obtenção dos extratos de *D. mertensii*, foi possível observar que para as algas em estado vegetativo mais avançado obteve-se um maior rendimento de extrato. Também foi possível observar que a última extração em MeOH puro não seria justificada, dependendo do foco do trabalho, pois ali foram extraídos apenas compostos mais polares, como açúcares.

Foram isolados diversos compostos, entretanto para a maioria não foi possível a identificação, devido ao baixo rendimento obtido. Outro ponto é que foram isoladas grandes quantidades de triglicerídeos e outros hidrocarbonetos saturados (os quais também não foram identificados), que parecem ser extremamente abundantes em extratos de algas pardas, e que dificultam o isolamento de outros metabólitos de interesse. Como resultados relevantes, foram isolados 3 diterpenos, sendo um do grupo dos xenianos, outro pertencente à classe dos guaianos prenilados, e um dialdeído, que não teve sua estrutura definida por ter-se degradado durante o processo.

Ao longo dos processos de fracionamento dos extratos, observou-se que determinados sinais nos espectros de hidrogênio sugestivos de hidrogênios desblindados tornavam-se cada vez menos intensos conforme o fracionamento avançava, sugerindo que tais compostos estavam sendo degradados. Esta (supostamente) alta sensibilidade dos diterpenos durante o processo de isolamento e identificação pode relacionar-se à reatividade com a sílica e também com solventes, e mesmo com o clorofórmio deuterado, utilizado na obtenção dos espectros de RMN.

Para o extrato oriundo da Ilha da Trindade foi isolado e identificado o diterpeno do tipo xeniano descrito originalmente como “diacetal *b*”, sendo este o seu primeiro relato para a espécie *D. mertensii*. Este composto mostrou ser fortemente citotóxico contra as linhagens celulares HCT-116, e 293A, e também foi ativo contra as linhagens tumorais PC3-M e B16-F10. Conforme sugerido por Ishitsuka e colaboradores (1982), o diacetal isolado poderia ser um artefato, formado pela reação entre o composto dictyodial e metanol, visto que foi utilizado o metanol no processo extrativo. Entretanto, para testar esta hipótese, seria necessário realizar nova extração do material com outro solvente,

sem que se possa ter garantia de que o novo material coletado reproduziria a composição química do material efetivamente estudado.

Ainda em relação ao composto diacetal *b*, pode se discutir sua importância ecológica. Para os autores Teixeira (2013) e Vallim et al. (2005) a espécie *D. mertensii* só produziria diterpenos do tipo guaiano prenilado. Contudo a própria revisão de Vallim e colaboradores (2005) acerca da distribuição de diterpenos mostra que, em certas temperaturas, pode ocorrer a reorganização estrutural do grupo I (guaiano prenilado) gerando compostos do tipo xeniano, grupo III. Tal fato abre um novo questionamento para este trabalho, com relação a possíveis efeitos do aquecimento global sobre a composição química das algas e a repercussão destas alterações sobre os ecossistemas marinhos.

Para o extrato do material coletado em Fernando de Noronha, foi identificado o pachidictyol A, o qual já foi descrito para esta espécie. Este composto mostrou-se fortemente ativo contra a linhagem tumoral HCT-116, e moderadamente ativo contra as linhagens tumorais PC3-M e B16-F10 e a linhagem de células normais 293A. Estudos de modelagem molecular podem ser considerados como perspectiva futura, com vistas ao desenvolvimento de derivados mais seletivos. Também foi isolado deste extrato um dialdeído cuja identificação não chegou a ser concluída, devido à degradação do metabólito.

É válido ressaltar, em relação à metodologia empregada para fracionamento dos extratos, que o ideal seria um menor número de procedimentos cromatográficos possível, não sendo tão indicados processos como coluna clássica, uma vez que esta aumenta o tempo de exposição dos compostos a sílica, solventes e ao próprio ar (em relação à CLAE), o que pode contribuir para a degradação dos compostos.

Como perspectivas abertas a partir do presente trabalho, podem-se destacar:

- Analisar por cromatografia líquida ou gasosa acopladas a espectrometria de massas (em abordagem como *Molecular networking*) os extratos obtidos, para tentar identificar preliminarmente os compostos presentes, antes de iniciar o processo de isolamento;

- Testar diferentes procedimentos de extrações para aumentar rendimento dos compostos de interesse;

- Avaliar métodos alternativos de extração, considerando os princípios da química verde, ou seja, sem o uso de solventes halogenados, diminuindo o volume de resíduos, uso de solventes de fontes renováveis, entre outras práticas;

- Otimizar os processos de isolamento e purificação, reduzindo o número de etapas antes da cromatografia líquida de alta eficiência preparativa;
- Realizar análise *in silico* dos compostos, considerando diferentes alvos moleculares e também possíveis modificações estruturais.





## 6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- os extratos de *D. mertensii* das ilhas da Trindade e Fernando de Noronha diferiram quimicamente quanto à composição de seus diterpenos majoritários, o que pode dever-se tanto às diferenças do estágio evolutivo, quanto a aspectos ambientais;

- ambos os extratos apresentaram moderada citotoxicidade, sendo que nos dois casos, os diterpenos isolados e identificados foram altamente citotóxicos e devem ser responsáveis, pelo menos em parte, pela atividade dos extratos;

- do extrato do material coletado na Ilha da Trindade foi isolado e identificado um diterpeno diacetal, que representa o primeiro relato para a espécie, sendo este fortemente citotóxico frente às as linhagens HCT-116 (câncer colorretal), 293A (células de rim embrionário); e moderadamente citotóxico contra as linhagens B16-F10 (melanoma metastático murino) e PC3-M (câncer de próstata metastático humano);

- do extrato do material provindo de Fernando de Noronha foram isolados dois diterpenos: o pachidictyol A, que já foi relatado para a espécie e um dialdeído não identificado;

- o pachidictyol A apresentou elevada citotoxicidade para as linhagens HCT-116, 293A; para as linhagens B16-F10 e PC3-M, mostrou-se moderadamente citotóxico.



## REFERÊNCIAS

- ALVARADO, A. B.; GERWICK, W. H. Dictyol H, a new tricyclic diterpenoid from the brown seaweed *Dictyota dentata*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 1, p. 132-134, 1985.
- ALIANÇA, A.S.S.; ANJOS, K.F.L.; REIS, T.N.V.; HIGINO, T.M.M.; BRELAZ-DE-CASTRO, M.C.A.; BIANCO, E.M.; FIQUEIREDO, R.C.B.Q. The in vitro biological activity of the Brazilian brown seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. **Molecules**, v. 19, p. 14052-14065, 2014.
- ALVES DE LIMA, L.; BARREIRO, C.C.; PIRES D.O.; LOPEZ-ABARRATEQUI, C.; GONÇALVES, E.F.; VASCONCELOS, I.M.; DE OLIVEIRA, J.T.; OTERO-GONZALEZ, A.J.; FRACO, O.L.; DIAS, S.C. Identification of a novel antimicrobial peptide from Brazilian coast coral *Phyllogorgia dilatata*. **Protein and Peptide Letters**, v. 20, n. 10, p. 1153-1158, 2013.
- AYYAD, S.-E. N.; ABDEL-HALIM, O.B.; SHIER, W.T.; HOYE, T.R. Cytotoxic hydroazulene diterpenes from the Brown Alga *Cytoseira myrica*. **Z. Naturforsch.** v.58c, p.33-38, 2003.
- AYYAD, S.-E. N.; MAKKI, M.S.; AL-KAYAL N.S.; BASAF, S.A.; EL-FOTY, K.O.; ASIRI, A.M.; ALARIF W.M.; BADRIA, F.A. Antioxidant, cytotoxic, antitumor, and protective DNA damage metabolites from the red sea brown alga *Sargassum* sp. **Pharmacognosy research**, v. 3, n. 3, p. 160, 2011.
- ANARAT-CAPPILLINO, G.; SATTELY, E. S. The chemical logic of plant natural product biosynthesis. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 19, p. 51-58, 2014.
- ARAÚJO, E.L.; ALENCAR, J.R.B.; NETO, P.J.R. Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.12, supl., p. 57-59, 2002.
- BEETUL, K.; GOPEECHUND, A.; KAULLYSING, D.; MATTAN-MOORGAWA, S.; PUCHOOA, D.; BHAGOOI, R. Challenges and opportunities in the present era of marine algal applications. In: **Algae-**

**Organisms for Imminent Biotechnology.** InTech, 2016. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/304614880\\_Challenges\\_and\\_Opportunities\\_in\\_the\\_Present\\_Era\\_of\\_Marine\\_Algal\\_Applications/citations](https://www.researchgate.net/publication/304614880_Challenges_and_Opportunities_in_the_Present_Era_of_Marine_Algal_Applications/citations)>. Acesso em 02/10/2016.

BLOUNT, J. F.; DUNLOP, R. W.; ERICKSON, K. L.; WELLS, R. J. Two diterpenes with new carbocyclic ring systems from an Australian collection of the brown alga *Dictyota dichotoma*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 35, p. 145-163, 1982.

BLUNT, J. W.; COPP, B. R.; KEYZERS, R. A.; MUNRO, M. H.; PRINSEP, M. R. Marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 35, p. 235-294, 2017.

BOUAÏCHA, N.; TRINGALI, C.; PESANDO, D.; MALLÉA, M.; ROUSSAKIS, C.; VERBIST, J. F. Bioactive diterpenoids isolated from *Dilophus ligulatus*. **Planta Medica**, v. 59, n. 03, p. 256-258, 1993.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente, 2017 (a). Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-aquatica/zona-costeira-e-marinha>> Acesso em 06 Abril 2017.

BRASIL, Marinha do Brasil, Ilhas oceânicas. 2017 (b). Disponível em <<https://www.mar.mil.br/secirm/portugues/ilhasoceanicas.html>> Acesso em 6 Abril 2017.

CAMPOS, A.; SOUZA, C.B.; LHULLIER, C.; FALKENBERG, M.; SCHENKEL, E. P.; RIBEIRO-DO-VALE, R. M.; SIQUEIRA, J. M. Anti-tumour effects of elatol, a marine derivative compound obtained from red algae *Laurencia microcladia*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 64, p.1146-1154, 2012.

CHENG, S.; ZHAO, M.; SUN, Z.; YUAN, W.; ZHANG, S.; XIANG, Z.; CAI, Y.; DONG, J.; HUANG, K.; YAN, P. Diterpenes from a Chinese Collection of the Brown Alga *Dictyota plectens*. **Journal of Natural Products**, v. 77, p. 2685-2693, 2014.

CLERCK, O.; LELIAERT, F.; VERBRUGGEN, H.; LANE, C.E.; DE PAULA, J.C.; PAYO, D.I.; COPPEJANS, E. A revised classification of the *Dictyotaceae* (*Dictyotales*, *Phaeophyceae*) based on rbcL and 26S

ribosomal DNA sequence data analyses. **Journal of Phycology**, v. 42, p. 1271-1288, 2006.

COSTA-LOTUFO, L.V.; WILKE, D.V.; JIMENEZ, P.C.; EPIFANIO, R.A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: histórico e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 703-716, 2009.

COSTELLO, M. J.; POHLE G.; MARTIN A. (2017). Evaluating biodiversity in marine environmental assessments. Research and Development Monograph Series 2001, Canadian Environmental Assessment Agency Ottawa, Canada. Disponível <[http://www.collectionscanada.gc.ca/webarchives/20071213100057/www.ceaa.gc.ca/015/001/019/print-version\\_e.htm](http://www.collectionscanada.gc.ca/webarchives/20071213100057/www.ceaa.gc.ca/015/001/019/print-version_e.htm)> Acesso em: 20 Abril 2017.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNEREM, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

DOS-SANTOS, A.O.; SANTOS, P.V.; NAKAMURA, T.U.; FILHO, B.P.D.; SUDATTI, D.B.; BIANCO, E. M.; PEREIRA, R.C.; NAKAMURA, C.V. Effect of elatol, isolated from red seaweed *Laurencia dendroidea*, on *Leishmania amazonensis*. **Marine Drugs**, v.8, n.11, p.2733-2743, nov., 2010.

FINER, J., CLARDY, J.; FENICAL, W.; MINALE, L.; RICCIO, R.; BATTAILE, J.; KIRKUP, M. MOORE, R. E. Structures of dictyodial and dictyolactone, inusual marine diterpenoids. **Journal of Organic Chemistry**, v. 44, p. 2044-2047, 1979.

FREITAS, O. do S. P.. **Perfil Químico e Ação Defensiva Comparativa de Extratos Brutos de Diferentes Localidades do Litoral Brasileiro da Alga Parda Marinha *Dictyota mertensii* (Dictyotales, Phaeophyta)**. 2006. 229 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Universidade Federal Fluminense. Niterói, 2006.

FREITAS, O.S.P.; OLIVEIRA, A.S.; DE-PAULA, J.C.; PEREIRA, R.C.; CAVALCANTI, D.N.; TEIXEIRA, V.L. Chemical variation in the diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota mertensii* (*Dictyotaceae, Phaeophyta*). **Natural Product Communications**, v. 2, n. 1, p. 13-15, 2007.

GUIRY, M.D.; GUIRY, G.M. **AlgaeBase**. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em <<http://www.algaebase.org>>. Acesso em 06 Abril 2017.

GUIRY, Michael D. How many species of algae are there? **Journal of Phycology**, v. 48, n. 5, p. 1057-1063, 2012.

HAY, M. E.; FENICAL, W. Chemical ecology and marine biodiversity: insights and products from the sea. **Oceanography**, v.9, p. 10-20, 1996.

HAY, M.E.; FENICAL, W.; GUSTAFFSON, K. Chemical defense against diverse coral-reef herbivores. **Ecology**, v. 68, n.6, p.1581-1591, 1987.

HIRSCHFELD, D. R.; FENICAL, W.; LIN, G. H. Y.; WING, R. M.; RADLICK, P.; SIMS, J. J. Pachydictyol A, an exceptional diterpene alcohol from the brown alga, *Pachydictyon coreaceum*. **Journal of the American Chemical Society**, v.95, n.12, p.4049-4050, 1973.

HU, Y.; CHEN, J.; HU, G.; YU, J.; ZHU, X.; LIN, Y.; CHEN, S.; YUAN, J. Statistical Research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. **Marine Drugs**, v. 13, p. 202-221, 2015.

IRELAND, C.; FAULKNER, D.J. A novel diterpene from *Dollabellacalifornica*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 98, n. 15, p. 4664-4665, 1976.

INCA, Estimativa 2018 – incidência de câncer no Brasil. Disponível em:<<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>> acesso em 22/03/2018.

INCA, Atlas on-line de morbidade 2018. 2018 (a). Disponível em:<<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo01/consultar.xhtml#panelResultado>>.Acesso em 01/01/2018.

INCA, Informativo de vigilância do câncer. 2018 (b). Disponível em:<[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/boletim\\_vigilancia\\_1.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/boletim_vigilancia_1.pdf)>. Acesso em 01/01/2018.

ISHITSUKA, M.; KUSUMI, K.; TANAKA, J.; KAKISAWA, H. New diterpenoids from *Pachydictyon coriaceum*. **Chemistry Letters**, v. 11, n. 10, p. 1517-1518, 1982.

KOBAYASHI, M.; KATO, Y.; KUROIWA, Y.; WATANABE, T.; OHNISHI-KAMEYAMA, M.; ONO, H.; OHKUBO, S.; MIYASHITA, H. Physicochemical properties of chlorophylls in oxygenic photosynthesis—succession of co-factors from anoxygenic to oxygenic photosynthesis. In: **Photosynthesis**. InTech, 2013. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/photosynthesis/physicochemical-properties-of-chlorophylls-in-oxygenic-photosynthesis-succession-of-co-factors-from->>. Acesso em 10/09/2017.

KELECOM, A.; TEIXEIRA, V.L.; PITOMBO, L.F. Quimiotaxonomia de *Dictyotales* (Phaeophyta). 6. Da sinonímia entre as algas pardas *Dictyota dentata* e *D. mertensii*. **Anais da Associação Brasileira de Química**, v.40, p.67-70, 1991.

LEE, R.E. **Phycology**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.

LHULLIER, C.; DONNANGELO, A.; CARO, M.; PALERMO, J.A.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M.; SCHENKEL, E.P. Isolation of elatol from *Laurencia microcladia* and its palatability to the sea urchin *Echinometra lucunter*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 4, p. 254-259, 2009.

LIU, L.; HEINRICH, M.; MYERS, S.; DWORJANYN, S. A. Towards a better understanding of medicinal uses of the brown seaweed *Sargassum* in Traditional Chinese Medicine: a phytochemical and pharmacological review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 591-619, 2012.

MALVE, H. Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 8, n. 2, p. 83, 2016.

MARTINS, A.; VIEIRA, H.; GASPAR, H.; SANTOS, S. Marketed marine natural products in the pharmaceutical and cosmeceutical industries: Tips for success. **Marine Drugs**, v. 12, p. 1066-1101, 2014.

MARQUES, L.V.; VILLAÇA, R.; PEREIRA, R.C. Susceptibility of macroalgae to herbivorous fishes at Rocal Atoll, Brazil. **Botanica Marina**, v. 49, p. 379-385, 2006.

MAYER, A.M.S.; RODRÍGUEZ, A.D.; TAGLIALATELA-SCAFATI, O.; FUSETANI, N. Marine Pharmacology in 2009–2011: Marine Compounds with Antibacterial, Antidiabetic, Antifungal, Anti-Inflammatory, Antiprotozoal, Antituberculosis, and Antiviral Activities; Affecting the Immune and Nervous Systems, and other Miscellaneous Mechanisms of Action. **Marine Drugs**, v. 11, p. 2510-2573, 2013.

MESQUITA, M. M. F.; BADDINI, A. L. Q.; NETTO, A. D. P.; ARAUJO, J. M.; SALGUEIRO, F.; FILHO, E. A. P. L.; DE-PAULA, J. C.; FLEURY, B.G.; CAVALCANTI, D. N.; TEIXEIRA, V. L. Chemical similarity between *Dictyota caribaea* and *Dictyota menstrualis* (Dictyotaceae, Pheophyceae) from the coast of Rio de Janeiro, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.58, p. 97-101, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MONTASER, R.; LUESCH, H. Marine natural products: a new wave of drugs? **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 12, p. 1475–1489, 2011.

MUNRO, M.H.G.; BLUNT, J.W.; DUMDEI, E. J., HICKFORD S. J. H.; LILL, R.E.; LI, S.; BATTERSHILL, C.N.; DUCKWORTH, A.R. The discovery and development of marine compounds with pharmaceutical potential. **Journal of Biotechnology**, v. 70, n. 1-3, p. 15-25, 1999.

NEWMAN, D. J. The Influence of Brazilian Biodiversity on Searching for Human Use Pharmaceuticals. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 3, p. 402-414, 2017.



NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Jornal of Natural Products**, v. 75, p. 311-335, 2012.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Marine-Sourced Anti-Cancer and Cancer Pain Control Agents in Clinical and Late Preclinical Development. **Marine Drugs**, v. 12, p. 255-278, 2014.

PATIL, A. D.; BERRY, D.; BROOKS, D. P.; HEMLING, M. E., KUMAR, N. V.; MITCHELL, M. P.; OHLSTEIN, E.H.; WESTLEY, J. W. A diterpene epoxide from the marine brown alga *Dictyota* sp.: Possible vasopressin V1 receptor antagonist. **Phytochemistry**, v. 33, n. 5, p. 1061-1064, 1993.

PATHIRANA, C.; ANDERSEN, R. J. Diterpenoids from the brown alga *Dictyota binghamiae*. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 62, n. 9, p. 1666-1671, 1984.

PATRA, B.; SCHULUTTERNHOFER, C.; WU, Y.; PATTANAIK, S.; YUAN, L. Transcriptional regulation of secondary metabolite biosynthesis in plants. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1829, p. 12361247, 2013.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**, tradução da 4ª ed norte americana, São Paulo, Cengage Learning, 2015.

PETERS, T.; TILLOTSON, J.; WILMORE, S.C.; YEOMANS, A.; PACKHAM, G.; CHAPMAN, E.; SCHATZ, J.H.; LI, L. The Marine Natural Compound Elatol Is a Novel Protein Translation Inhibitor with Potent Activity Against Aggressive Non-Hodgkin Lymphomas. **Blood**, v.130, n. 1, p. 4112, 2017.

PHILIPPUS, A. C. **Investigação química de extratos de algas pardas do Atlântico sul brasileiro**. 2016.150 f. Dissertação (Mestrado em Farmácia) – Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

QUEIROZ, K.C.S.; MEDEIROS, V.P.; QUEIROZ, L.S.; ABREU, L.R.D.; ROCHA, H.A.O.; FERREIRA, C.V.; JUCÁ, M.B.; AOYAMA,

H.; LEITE, E.L. Inhibition of reverse transcriptase activity of HIV by polysaccharides of brown algae. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 62, p. 303-307, 2008.

RANDALL, R.L.; CABLE, M.G. Trabectedin tactics: from sea squirts to sarcomas. **The Lancet Oncology**, v. 16, n. 3, p. 243-244, 2015.

RANGEL, M.; PRADO, M.P.; KONNO, K.; NAOKI, H.; FREITAS, J.C.; MACHADO-SANTELLI, G.M. Cytoskeleton alterations induced by *Geodia corticostylifera* depsipeptides in breast cancer cells. **Peptides**, v. 27, n. 9, p. 2047-2057, 2006.

RANGEL, M.; FALKENBERG, M. An overview of the marine natural products in clinical trials and on the market. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 3, n. 6, p. 421-428, 2015.

RAVI, B. N.; WELLS, R. J. New Nine-Membered Ring Diterpenes from the Brown Alga *Dictyota prolificans*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 35, p. 121-128, 1982.

REVIERS, B. **Biologia e filogenia das algas**. Porto Alegre: Artmed, 2006. 280 p.

SIAMOPOULOU, P.; BIMPLAKIS, A.; ILIOPOULOU, D.; VAGIAS, C.; COS, P.; BERGHE, D.V.; ROUSSIS, V. Diterpenes from the brown algae *Dictyota dichotoma* and *Dictyota linearis*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2025-2030, 2004.

SILBERFELD, T.; ROUSSEAU, F.; REVIERS, B. An updated classification of brown algae (*Ochrophyta*, *Phaeophyceae*). **Cryptogamie Algologie**, v. 35, n. 2, p. 117-156, 2014.

SOARES, P.; LIMA, J.; PRETO, A.; CASTRO, P.; VINAGRE, J.; CELESTINO, R.; COUTO, J.P.; PRAZERES, H.; ELOY, C.; MAXIMO, V.; SOBRINHO-SIMÕES, M. Genetic alterations in poorly differentiated and undifferentiated thyroid carcinomas. **Current Genomics**, v. 12, n. 8, p. 609-617, 2011.

STENGEL, D.B.; CONNAN, S.; POPPER, Z.A. Algal chemodiversity and bioactivity: sources of natural variability and implications for

commercial applications. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 5, p. 483-501, 2011.

STOUT, E. P.; KUBANEK, J. Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology. In: Mander, L.; Lui, H.W. (Eds.). **Marine Macroalgal Natural Products**. Oxford: Elsevier, 2010, vol. 2, p.41-65.

TANAKA, J.; HIGA, T. Hydroxydictyodial, a new antifeedant diterpene from the brown alga *Dictyota spinulosa*. **Chemistry Letters**, p. 221-232, 1984.

TEIXEIRA, V.L. Produtos naturais de algas marinhas bentônicas. **Revista Virtual de Química**, 2013. Disponível em: < <http://www.uff.br/RVQ/index.php/rvq/article/viewArticle/346>>. Acesso em: 10 Abril 2017.

TEIXEIRA, V. L., CAVALCANTI, D. N., PEREIRA, R. C. Chemotaxonomic study of the diterpenes from the brown alga *Dictyota menstrualis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, n. 3, p. 313-316, 2001.

TEIXEIRA, V.; KELECOM, A. A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown algae of the genus *Dictyota*. **The science of the total environment**, v. 75, p. 271-283, 1988.

VAIRAPPAN, C.S.; DALTON, M.; SUZUKI, M.; ABE, T.; MASUDA, M. Antibacterial halogenated metabolites from the Malaysian *Laurencia* species. **Phytochemistry**, v.58, n.2, p.291-297, sep., 2001.

VAIRAPPAN, C.S. Potent antibacterial activity of halogenated metabolites from Malaysian red algae, *Laurencia majuscula* (Rhodomelaceae, Ceramiales). **Biomolecular Engineering**, v.20, n.4-6, p.255-259, jul., 2003.

VALLIM, M.A.; TEIXEIRA, V.T.; PEREIRA, R.C. Feeding-deterrent properties of diterpenes of *Dictyota mertensii* (*Phaeophyceae, Dictyotales*). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 55, n. 3, p. 223229, 2007.

VALLIM, M. A.; DE PAULA, J. C.; PEREIRA, R. C.; TEIXEIRA, V. L. The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical

Atlantic American region. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n.1, p. 1-16, 2005.