



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**FÁBIO DO NASCIMENTO ÁVILA**

**ESTUDO QUÍMICO DAS ALGAS PARDAS *LOBOPHORA VARIEGATA*,  
*DICTYOTA MENSTRUALIS*, *DICTYOTA MERTENSII* E INVESTIGAÇÃO  
FARMACOLÓGICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS**

**FORTALEZA**

**2019**

FÁBIO DO NASCIMENTO ÁVILA

ESTUDO QUÍMICO DAS ALGAS PARDAS *LOBOPHORA VARIEGATA*, *DICTYOTA MENSTRUALIS*, *DICTYOTA MERTENSII* E INVESTIGAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica

Orientadora: Profa. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Sistema de Bibliotecas  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

Á972e Ávila, Fábio do Nascimento.

Estudo químico das algas pardas *Lobophora variegata*, *Dictyota menstrualis*, *Dictyota mertensii* e investigação farmacológica dos compostos isolados / Fábio do Nascimento Ávila. – 2019.

211 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019.

Orientação: Profa. Dra. Otilia Deusdênia Loliola Pessoa.

1. Dictyotaceae. 2. *Lobophora variegata*. 3. *Dictyota menstrualis*. 4. *Dictyota mertensii*. 5. Atividades biológicas. I. Título.

CDD 540

---

FÁBIO DO NASCIMENTO ÁVILA

ESTUDO QUÍMICO DAS ALGAS PARDAS *LOBOPHORA VARIEGATA*, *DICTYOTA MENSTRUALIS*, *DICTYOTA MERTENSII* E INVESTIGAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química. Área de concentração: Química Orgânica

Aprovada em: 13/12/2019.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Otília Deusdênia Loiola Pessoa (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos  
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

---

Prof. Dr. Kirley Marques Canuto  
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)

---

Prof. Dr. Mary Anne Sousa Lima  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A minha esposa Antônia  
Aos meus filhos Luna e Levi

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades e conquistas em minha vida.

Ao CNPq pela concessão de bolsa pesquisa.

A Professora Dra. Otília Deusdênia L. Pessoa, por pacientemente me orientar, me permitindo desenvolver ao longo de mais quatro anos o presente trabalho.

Ao Professor Dr. Edilberto Rocha Silveira, coordenador do CENAURENM por sua inquestionável colaboração e por ser uma inspiração acadêmica.

Aos parceiros acadêmicos que contribuíram para a realização de etapas fundamentais do trabalho

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química que tive a honra e o prazer de compartilhar momentos de aprendizagem em sala de aula.

A minha família que sempre me apoiou e incentivou minhas escolhas na minha vida profissional e pessoal.

A minha filha que se tornou o pilar fundamental de minha vida

Aos meus colegas e amigos da UFC, principalmente os membros da família LAFIPLAN que me receberam com carinho e sempre me ajudaram no decorrer destes anos.

A todas as pessoas que de maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

## RESUMO

Neste trabalho foram investigados os extratos das algas pardas *Lobophora variegata*, *Dictyota menstrualis* e *Dictyota mertensii* (Phaeophyceae, Dictyotaceae), resultando no isolamento de vinte e dois compostos. Das espécies de *Dictyota* foram isolados diterpenos de esqueletos variados como, guaiano e cadinano prenilados, crenulidano e dollabelano. Destes compostos, quatro foram descritos pela primeira vez. A partir da alga *D. mertensii* foi também isolado sais de aminas quaternárias. De *L. variegata* os compostos isolados foram álcoois e epóxidos de cadeia longa, dois dos quais inéditos. Para o isolamento dos compostos foram utilizados métodos cromatográficos clássicos, incluindo cromatografia em coluna sobre gel de sílica, Sephadex LH-20 e cromatografia líquida de alta eficiência. A determinação estrutural dos compostos foi realizada através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas como: espectrometria de massas (EMAR-ESI, APCI, CG-EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$   $\text{C}^{13}$ , incluindo técnicas bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC), além de comparação com dados registrados na literatura. Os compostos foram submetidos a ensaios de atividade citotóxica, utilizando linhagens de células cancerígenas (HCT-116) e normal (RAW-264.7), antimicrobiana, contra cepas de bactérias Gram-positiva (*S. aureus* ATCC 6538P) e Gram-negativa (*E. coli* ATCC 10536), antioxidante (DPPH) e anti-inflamatório. Os epóxidos de cadeia longa designados de epóxi-lobophorenos A e B (isolados de *L. variegata*) apresentaram efeito anti-inflamatório e antioxidante, enquanto os diterpenos designados de dictyóis K, M, N, O (isolados de *D. menstrualis*) mostraram atividade anti-inflamatória semelhante ao da dexametasona, um potente anti-inflamatório de uso clínico.

**Palavras-chave:** *Dictyotaceae*; *Lobophora variegata*; *Dictyota menstrualis*; *Dictyota mertensii*; atividade citotóxica; atividade antimicrobiana; atividade anti-inflamatória.

## ABSTRACT

In this work, the extracts from the algae *Lobophora variegata*, *Dictyota menstrualis* and *Dictyota mertensii* (Phaeophyceae, Dictyotaceae) were investigated, resulting in the isolation of twenty-two compounds. From *Dictyota* species were isolated diterpenes of different skeletons such as prenilated guaiane and cadinane, crenulidane and dollabelane. Among these compounds, four have been described for the first time. From *L. variegata* were isolated long-chain alcohol and epoxide, two of which are new compounds. The compounds were isolated using classic methods of chromatography including chromatography on silica gel, sephadex LH-20 and high performance liquid chromatography. The structure elucidation of compounds was performed by spectroscopic methods such as: mass spectrometry (HRESIMS, APCI and GC-MS) and nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR) including bidimensional techniques (COSY, HSQC e HMBC), and comparison with literature data. The isolated compounds were evaluated for their cytotoxicity against the cancer cell line (HCT-116 and RAW-264.7), antimicrobial properties against Gram-positive (*S. aureus* ATCC 6538P) and Gram-negative (*E. coli* ATCC 10536) bacteria strains, antioxidant (DPPH) and anti-inflammatory effects. The long-chain epoxides designated as epoxy-lobophorenes A and B (isolated of *L. variegata*) showed anti-inflammatory and antioxidant effects, while the diterpenes designated dictyols K, M, N and O (isolated of *D. menstrualis*) showed anti-inflammatory activity comparable to dexamethasone, a potent anti-inflammatory drug in clinical use.

**Keywords:** *Dictyotaceae*; *Lobophora variegata*; *Dictyota menstrualis*; *Dictyota mertensii*; cytotoxic activity; antimicrobial activity; anti-inflammatory activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 - Áreas de aplicação dos compostos obtidos de organismos marinhos no período de 1996-2016 .....	21
Figura 02 - Moléculas obtidos por organismos marinho no período de 2012-2017... ..	22
Figura 03 - Locais de coleta das espécies de algas .....	25
Figura 04 - <i>L. variegata</i> , vista pela porção superior.....	30
Figura 05 - Número de publicações para a espécie <i>L. variegata</i> .....	31
Figura 06 - Representação estrutural dos compostos obtidos de espécies do gênero <i>Lobophora</i> .....	32
Figura 07 - Locais de coleta de <i>L. variegata</i> no litoral cearense.....	33
Figura 08 - Cromatograma de isolamento de LV-02 e LV-03 .....	34
Figura 09 - Cromatograma de isolamento de LV-05, LV-06 e LV-07.....	36
Figura 10 - Cromatograma de isolamento de LV-08 e LV-09 .....	36
Figura 11 - Principais correlações observadas para DM-01 .....	38
Figura 12 - Representação estrutural de LV-01.....	38
Figura 13 - Proposta estrutural de LV-02 com base no espectro COSY.....	41
Figura 14 - Principais correlações ( $^2J_{CH}$ e $^3J_{CH}$ ) observadas para os fragmentos de LV- 02 .....	41
Figura 15 - Proposta de fragmentação para LV-02 .....	42
Figura 16 - Representação estrutural de LV-02.....	42
Figura 17 - Deslocamentos químicos de RMN $^{13}C$ para LV-02 e LV-03 .....	44
Figura 18 - Principais correlações observadas no espectro HMBC de LV-03.....	44
Figura 19 - Representação estrutural de LV-03.....	45
Figura 20 - Correlações observados no espectro de HMBC para LV-04 .....	46
Figura 21 - Representação estrutural do fucosterol.....	47
Figura 22 - Subestruturas A e B e suas correlações no espectro de HMBC.....	50
Figura 23 - Estrutura proposta de LV-05 .....	50
Figura 24 - Fucoxantina (A), principais subprodutos de degradação/oxidação.....	51

Figura 25 - Principais correlações no espectro de HMBC de LV-06 .....	53
Figura 26 - Representação estrutural de LV-06.....	54
Figura 27 - Correlações (A) e acoplamentos (B) para LV-07 .....	56
Figura 28 - Representação estrutural de LV-07.....	56
Figura 29 - Principais Acoplamentos e correlações observados no espectro COSY (A) e HMBC (B) .....	58
Figura 30 - Etapa de formação de LV-08 a partir da degradação de carotenóides ...	59
Figura 31 - Principais correlações observadas no espectro de HMBC para LV-09...	61
Figura 32 - Representação estrutural de LV-08 (loliolideo) e LV-09 (isololiolideo) ...	61
Figura 33 - Potencial antioxidante de LV-02 e LV-03 pelo teste DPPH .....	62
Figura 34 - Efeito antiproliferativo dos epóxi-lobophorenos sobre células tipo RAW-264.7 .....	64
Figura 35 - Efeito dos compostos LV-02 e LV-03 em células RAW-264.7 estimuladas ou não com LPS na produção de ON .....	65
Figura 36 - Produção das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em células RAW-264.7 estimuladas com LPS e tratadas com os compostos LV-02 e LV-03 .....	66
Figura 37 - <i>Dictyota menstrualis</i> , vista frontal.....	70
Figura 38 - Artigos publicados em periódicos nos últimos 20 anos sobre o gênero <i>Dictyota</i> .....	70
Figura 39 - Esquema biogenético para os diterpenos isolados nas <i>Dictyotas</i> .....	71
Figura 40 - Principais classes de diterpenos do grupo 1 .....	73
Figura 41 - Representação estrutural de diterpenos de esqueleto: (a) dolabellano, (b) dolastano e (c) seco-dolastano .....	74
Figura 42 - Representação estrutural dos diterpenos de esqueleto: (a) xenicano, (b) crenulidano, (c) dichotomano e (d) crenulano .....	74
Figura 43 - Novos diterpenos isolados de <i>D. pinnatifada</i> .....	75
Figura 44 - Locais de coleta de <i>D. menstrualis</i> e <i>D. mertensii</i> no litoral cearense ....	75
Figura 45 - Cromatogramas de isolamento dos compostos DM-01 a DM-03 .....	77

Figura 46 - Cromatogramas de isolamento dos compostos DM-04 a DM-08 .....	78
Figura 47 - Cromatogramas de isolamento de DM-09 a DM-11 (A) e DM-12 .....	80
Figura 48 - Cromatograma de isolamento de DM-13 .....	80
Figura 49 - Esqueleto base de diterpenos guaiano prenilado .....	82
Figura 50 - Correlações ( $^2J_{CH} - ^3J_{CH}$ ) observadas no espectro HMBC de DM-01 .....	83
Figura 51 - Principais acoplamentos observados para DM-01 .....	83
Figura 52 - Fragmentos observados de massas (EMAR-ESI) para DM-01 .....	84
Figura 53 - Acoplamentos dipolares observados no espectro de NOESY .....	84
Figura 54 - Representação estrutural proposta para dictyol M (B).....	85
Figura 55 - Principais acoplamentos (a) e correlações (b) observados para os espectros de COSY e HMBC, respectivamente .....	87
Figura 56 - Principais acoplamentos dipolares observados no espectro NOESY para DM-02 .....	88
Figura 57 - Representação estrutural para DM-02 .....	88
Figura 58 - Principais correlações (a) e acoplamentos (b) observados para os espectros HMBC e COSY .....	90
Figura 59 - Principais acoplamentos dipolares de DM-03 observado no espectro NOESY .....	91
Figura 60 - Representação estrutural de DM-03 .....	91
Figura 61 - Estrutura básica de diterpenos de esqueleto crenulidano .....	94
Figura 62 - Principais correlações observadas no espectro de HMBC de DM-04.....	94
Figura 63 - Representação estrutural para DM-04 .....	95
Figura 64 - Principais correlações observadas no espectro de HMBC de DM-05.....	97
Figura 65 - Proposta Biosintética para formação dos diterpenos acetoxicrenulídeo (a) e Isoacetoxicrenulatina (b) .....	97
Figura 66 - Representação estrutural para DM-05 .....	98
Figura 67 - Principais correlações no espectro de HMBC para DM-06.....	100
Figura 68 - Representação estrutural para DM-06 .....	101
Figura 69 - Representação estrutural do esqueleto base cadinano (a) e suas	

correlações observadas no espectro de HMBC (b) .....	103
Figura 70 - Principais fragmentos observados no espectro de EMAR de DM-07 ...	103
Figura 71 - Estereoquímica relativa proposta para DM-07 .....	104
Figura 72 - Representação estrutural de DM-07 .....	104
Figura 73 - Principais correlações observadas no espectro de HMBC de DM-08...	106
Figura 74 - Representação estrutural para DM-08 .....	106
Figura 75 - Principais acoplamentos e correlações observados para DM-09 nos espectros bidimensionais COSY e HMBC .....	108
Figura 76 - Principais fragmentos observados no espectro de massas .....	109
Figura 77 - Representação estrutural de DM-09 .....	109
Figura 78 - Principais fragmentos observados no espectro de massas .....	110
Figura 79 - Representação estrutural de DM-10 .....	110
Figura 80 - Principais correlações observadas para DM-11 no espectro HMBC ....	112
Figura 81 - Principais fragmentos observados no espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI+) para DM-11 .....	113
Figura 82 - Estereoquímica relativa observada para DM-11.....	113
Figura 83 - Representação estrutural para DM-11 .....	114
Figura 84 - Principais correlações para DM-12 no espectro de HMBC.....	115
Figura 85 - Representação estrutural para DM-12 .....	116
Figura 86 - Representação estrutural do esqueleto dolabellano (a) e principais correlações no espectro 2D HMBC para DM-13 (b) .....	118
Figura 87 - Principais fragmentos observados no espectro de massas de alta resolução (EMAR-ESI+) para DM-13 .....	118
Figura 88 - Estrutura proposta de DM-13 .....	118
Figura 89 - Atividade inibitória na produção de ON em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.....	123

## LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 01 - Metodologia de fracionamento do ext. hexânico de <i>L. variegata</i> ...	35
Fluxograma 02 - Metodologia de fracionamento do ext. AcOEt de <i>L variegata</i> .....	37
Fluxograma 03 - Metodologia de fracionamento do extrato hexânico de <i>Dictyota menstrualis</i> .....	77
Fluxograma 04 - Metodologia de fracionamento do extrato acetato de etila de <i>Dictyota menstrualis</i> .....	79
Fluxograma 05 - Metodologia de fracionamento do extrato AcOEt de <i>D mertensii</i> ...	81

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Lista de algas coletadas no litoral oeste do estado do Ceará .....	25
Tabela 02 - Triagem dos extratos das algas .....	27
Tabela 03 - Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de LV-01 e comparação com a literatura.....	39
Tabela 04 - Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ ( $\delta_H$ , $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) e $^{13}\text{C}$ ( $\delta_C$ , $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de LV-02 e suas principais correlações .....	43
Tabela 05 - Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ ( $\delta_H$ , $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) e $^{13}\text{C}$ ( $\delta_C$ , $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de LV-03 e suas principais correlações .....	45
Tabela 06 - Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ ( $\delta_H$ , $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) e $^{13}\text{C}$ ( $\delta_C$ , $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de LV-04 e comparação com a literatura .....	48
Tabela 07 - Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ ( $\delta_H$ , MeOD, 500 MHz) e $^{13}\text{C}$ ( $\delta_C$ , MeOD, 125 MHz) de LV-06 e comparação com a literatura.....	52
Tabela 08 - Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz), $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz) de LV-06 e comparação com a literatura .....	54
Tabela 09 - Dados de RMN $^1\text{H}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) e $^{13}\text{C}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de LV-07 e comparação com dados da literatura .....	57
Tabela 10 - Deslocamentos químicos de RMN $^1\text{H}$ (MeOD, 300 MHz) e $^{13}\text{C}$ (MeOD, 75 MHz) de LV-08 e comparação com dados da literatura.....	60
Tabela 11 - Dados de RMN $^1\text{H}$ (MeOD, 300 MHz) e $^{13}\text{C}$ (MeOD, 75 MHz) e comparação com a literatura .....	61
Tabela 12 - Concentração inibitória média dos extratos e compostos isolados da alga parda <i>Lobophora variegata</i> em células cancerígenas HCT-116 ....	63
Tabela 13 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DM-01 .....	86
Tabela 14 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DM-02 .....	89
Tabela 15 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DM-03 .....	92
Tabela 16 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DM-04 .....	96
Tabela 17 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DM-05 .....	99
Tabela 18 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DM-06 .....	101

Tabela 19 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DM-07 .....	105
Tabela 20 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DM-08 .....	107
Tabela 21 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DM-09 e DM-10.....	111
Tabela 22 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DM-11 .....	114
Tabela 23 - Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DM-12 .....	116
Tabela 24 - Dados de RMN $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ e HMBC de DM-13.....	119
Tabela 25 - Citotoxicidade dos compostos em linhagens de macrófagos	
RAW-264.7 estimuladas com LPS (1 $\mu\text{g/ml}$ ) .....	121
Tabela 26 - Efeito inibitório dos compostos puros na produção do óxido nítrico	
sobre macrófagos RAW 264.7 estimuladas com LPS .....	122

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BB	Broad Band
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CENAUREMN	Centro Nordestino de Ressonância Magnética Nuclear
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DM	<i>Dictyota menstrualis</i>
EMAR	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
ESY	Electrospray
FUNCAP	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
IES	Ionização por Electrospray
LEMANOR	Laboratório de Espectrometria de Massas do Nordeste
LV	<i>Lobophora variegata</i>
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
ON	Óxido Nítrico
PDA	Photodiode Array Detector

PF	Ponto de Fusão
PRONEX	Programa de Apoio a Núcleos de Excelência
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
TCC	Trabalho de Conclusão de Curso
$T_R$	Tempo de Retenção
UFC	Universidade Federal do Ceará
UV	Ultravioleta

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
1.1	<b>Aspectos Gerais</b> .....	21
1.2	<b>Objetivo Geral</b> .....	23
1.2.1	<b>Objetivos específicos</b> .....	23
1.3	<b>Detalhamento estrutural do trabalho</b> .....	23
2	<b>TRIAGEM DOS EXTRATOS DAS ALGAS</b> .....	24
2.1	<b>Seleção do material biológico</b> .....	24
2.2	<b>Triagem dos extratos orgânicos</b> .....	26
3	<b>LOBOPHORA VARIEGATA</b> .....	28
3.1	<b>Aspectos gerais</b> .....	28
3.2	<b>Considerações sobre a espécie <i>L. Variegata</i></b> .....	29
3.3	<b>Revisão Bibliográfica do gênero <i>Lobophora</i></b> .....	31
3.4	<b>Estudo do material biológico de <i>L. variegata</i></b> .....	32
3.4.1	<b><i>Coleta, preparação e perfil cromatográfico dos extratos</i></b> .....	32
3.4.1.1	<i>Fracionamentos cromatográficos do extrato hexânico</i> .....	33
3.4.1.2	<i>Fracionamentos cromatográficos do extrato acetato de etila</i> .....	35
3.5	<b>Resultados</b> .....	37
3.5.1	<b><i>Determinações estruturais</i></b> .....	37
3.5.1.1	<i>Determinação estrutural dos compostos do extrato hexânico</i> .....	37
3.5.1.1.1	Determinação estrutural de LV-01 .....	37
3.5.1.1.2	Determinação estrutural de LV-02.....	41
3.5.1.1.3	Determinação estrutural de LV-03.....	43
3.5.1.1.4	Determinação estrutural de LV-04.....	46
3.5.1.2	<i>Determinação estrutural dos compostos do extrato acetato de etila</i> .....	49
3.5.1.2.1	Determinação estrutural de LV-05.....	49
3.5.1.2.2	Determinação estrutural de LV-06.....	52
3.5.1.2.3	Determinação estrutural de LV-07.....	55

3.5.1.2.4	Determinação estrutural de LV-08.....	57
3.5.1.2.5	Determinação estrutural de LV-09.....	60
<b>3.5.2</b>	<b>Resultados dos testes farmacológicos</b> .....	<b>62</b>
3.5.2.1	Ensaio de atividade antimicrobianos.....	62
3.5.2.2	Ensaio de atividade antioxidante .....	62
3.5.2.3	Ensaio de atividade citotóxico.....	63
3.5.2.4	Ensaio de atividade anti-inflamatório .....	64
<b>3.6</b>	<b>Considerações sobre o capítulo</b> .....	<b>67</b>
<b>4</b>	<b>ESTUDO DE <i>D. MENSTRUALIS</i> E <i>D. MERTENSII</i></b> .....	<b>68</b>
<b>4.1</b>	<b>Aspectos gerais</b> .....	<b>68</b>
<b>4.2</b>	<b>Considerações acerca das espécies <i>D. menstrualis</i> e <i>D. mertensii</i></b> ....	<b>68</b>
<b>4.3</b>	<b>Revisão Bibliográfica do gênero <i>Dictyota</i></b> .....	<b>70</b>
<b>4.4</b>	<b>Estudo do material biológico de <i>D. menstrualis</i> e <i>D. mertensii</i></b> .....	<b>75</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Coleta, preparação e perfil cromatográfico dos extratos</b> .....	<b>75</b>
4.4.1.1	Fracionamentos cromatográficos do extrato hexânico de <i>D. menstrualis</i> ..	76
4.4.1.2	Fracionamentos cromatográficos do extrato AcOEt de <i>D. menstrualis</i> .....	77
4.4.1.3	Fracionamentos cromatográficos do extrato AcOEt de <i>D. mertensii</i> .....	79
<b>4.5</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>81</b>
<b>4.5.1</b>	<b>Determinação estrutural dos compostos isolados de <i>D. menstrualis</i></b>	<b>81</b>
4.5.1.1	Determinação estrutural dos compostos ext. hexânico de <i>D. menstrualis</i> .	81
4.5.1.1.1	Determinação estrutural de DM-01 .....	81
4.5.1.1.2	Determinação estrutural de DM-02.....	86
4.5.1.1.3	Determinação estrutural de DM-03.....	89
4.5.1.2	Determinação estrutural dos compostos ext. AcOEt de <i>D. menstrualis</i> .....	93
4.5.1.2.1	Determinação estrutural de DM-04.....	93
4.5.1.2.2	Determinação estrutural de DM-05.....	96
4.5.1.2.3	Determinação estrutural de DM-06.....	99
4.5.1.2.4	Determinação estrutural de DM-07.....	102
4.5.1.2.5	Determinação estrutural de DM-08.....	105

<b>4.5.2</b>	<b><i>Determinação estrutural dos compostos isolados de D. mertensii...</i></b>	<b>107</b>
4.5.2.1	<i>Determinação estrutural dos metabolitos do extrato AcOEt.....</i>	107
4.5.2.1.1	<i>Determinação estrutural de DM-09.....</i>	107
4.5.2.1.2	<i>Determinação estrutural de DM-10.....</i>	109
4.5.2.1.3	<i>Determinação estrutural de DM-11.....</i>	111
4.5.2.1.4	<i>Determinação estrutural de DM-12.....</i>	115
4.5.2.1.5	<i>Determinação estrutural de DM-13.....</i>	117
<b>4.5.3</b>	<b><i>Resultados dos testes farmacológicos</i></b>	<b>120</b>
4.5.3.1	<i>Ensaio de atividade antimicrobianos.....</i>	120
4.5.3.2	<i>Ensaio de atividade citotóxico.....</i>	120
4.5.3.3	<i>Ensaio de viabilidade celular.....</i>	120
4.5.3.4	<i>Teste de inibição da produção do ON.....</i>	121
<b>4.6</b>	<b><i>Considerações sobre o capítulo</i></b>	<b>124</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>125</b>
<b>5.1</b>	<b>Métodos Cromatográficos</b>	<b>125</b>
5.1.1	<i>Cromatografia de adsorção.....</i>	125
5.1.2	<i>Cromatografia de adsorção em camada delgada.....</i>	125
5.1.3	<i>Cromatografias de Exclusão.....</i>	126
5.1.4	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</i>	126
5.1.4.1	<i>Métodos de análise por CLAE.....</i>	126
5.1.4.2	<i>Métodos de isolamento por CLAE.....</i>	127
<b>5.2</b>	<b>Métodos Físicos</b>	<b>128</b>
5.2.1	<i>Ponto de fusão.....</i>	128
5.2.2	<i>Rotação óptica.....</i>	128
5.2.3	<i>Espectrometria de massa (EMAR).....</i>	128
5.2.4	<i>Espectrometria de massa (CG-EM).....</i>	129
5.2.5	<i>Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).....</i>	129
<b>5.3</b>	<b>Testes biológicos e farmacológicos</b>	<b>130</b>
5.3.1	<i>Ensaio antimicrobiano.....</i>	130

<b>5.3.2</b>	<b><i>Avaliação do efeito citotóxico</i></b> .....	130
5.3.2.1	<i>Pelo método MTT</i> .....	131
5.3.2.2	<i>Pelo método SRB</i> .....	131
<b>5.3.3</b>	<b><i>Teste antioxidante (DPPH)</i></b> .....	132
<b>5.3.4</b>	<b><i>Ensaio de atividade anti-inflamatório</i></b> .....	133
5.3.4.1	<i>Teste de inibição da produção do ON (Óxido nítrico)</i> .....	133
5.3.4.2	<i>Ensaio imunoenzimático ELISA</i> .....	134
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	135
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	136
	<b>APÊNDICE A – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-01</b> .....	143
	<b>APÊNDICE B – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-02</b> .....	145
	<b>APÊNDICE C – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-03</b> .....	150
	<b>APÊNDICE D – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-04</b> .....	153
	<b>APÊNDICE E – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-05</b> .....	156
	<b>APÊNDICE F – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-06</b> .....	160
	<b>APÊNDICE G – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-07</b> .....	162
	<b>APÊNDICE H – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-08</b> .....	165
	<b>APÊNDICE I – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-09</b> .....	168
	<b>APÊNDICE J – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-01</b> .....	171
	<b>APÊNDICE K – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS</b>	

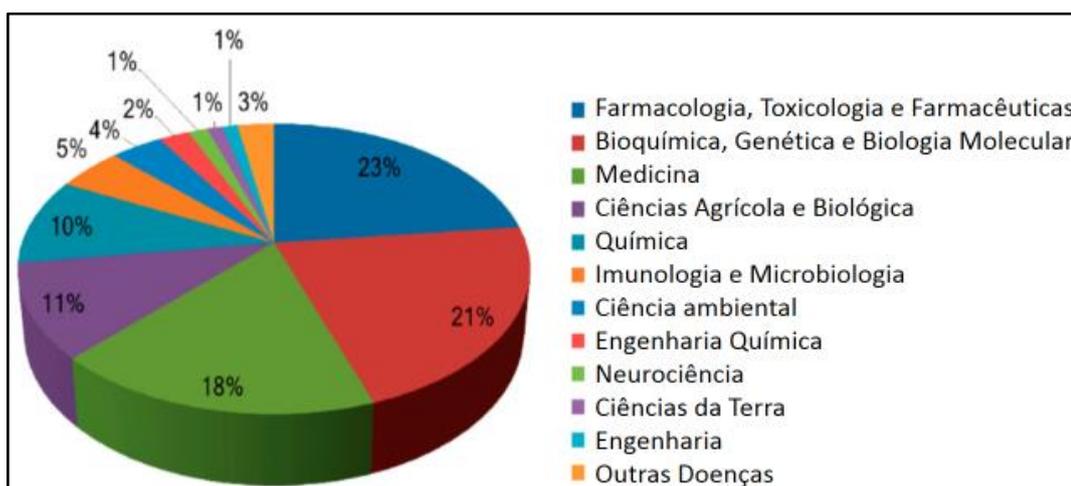
<b>PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-02 .....</b>	<b>177</b>
<b>APÊNDICE L – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS</b>	
<b>PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-03 .....</b>	<b>181</b>
<b>APÊNDICE M – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS</b>	
<b>PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-04 .....</b>	<b>184</b>
<b>APÊNDICE N – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS</b>	
<b>PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-05 .....</b>	<b>188</b>
<b>APÊNDICE O – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS</b>	
<b>PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-06 .....</b>	<b>192</b>
<b>APÊNDICE P – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS</b>	
<b>PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-07 .....</b>	<b>194</b>
<b>APÊNDICE Q – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS</b>	
<b>PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-08 .....</b>	<b>198</b>
<b>APÊNDICE R – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS</b>	
<b>PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-09 .....</b>	<b>200</b>
<b>APÊNDICE S – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS</b>	
<b>PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-10 .....</b>	<b>203</b>
<b>APÊNDICE T – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS</b>	
<b>PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-11 .....</b>	<b>206</b>
<b>APÊNDICE U – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS</b>	
<b>PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-12 .....</b>	<b>209</b>
<b>APÊNDICE V – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS</b>	
<b>PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-13 .....</b>	<b>211</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos Gerais

Os oceanos e mares ocupam mais de 70% de toda a superfície, sendo o lar de uma grande biodiversidade de organismos. Nos ecossistemas marinhos podem ser encontrados representantes de cerca de 34 dos 36 filos, englobando 250 mil espécies de animais marinhos, com potencial para descoberta de até 1 milhão de novas espécies e cerca de 10-100 milhões de microrganismos (Montaser; Luesch, 2011). Esta grande diversidade de organismos reflete na gigantesca variedade de substâncias químicas singulares e disponíveis, com incontestáveis aplicações biológicas, ecológicas e farmacológicas, atraindo cada vez mais a atenção da comunidade científica e das grandes indústrias farmacêuticas (Figura 1, p. 21). (Ruocco; Constantini; Constantini, 2016)

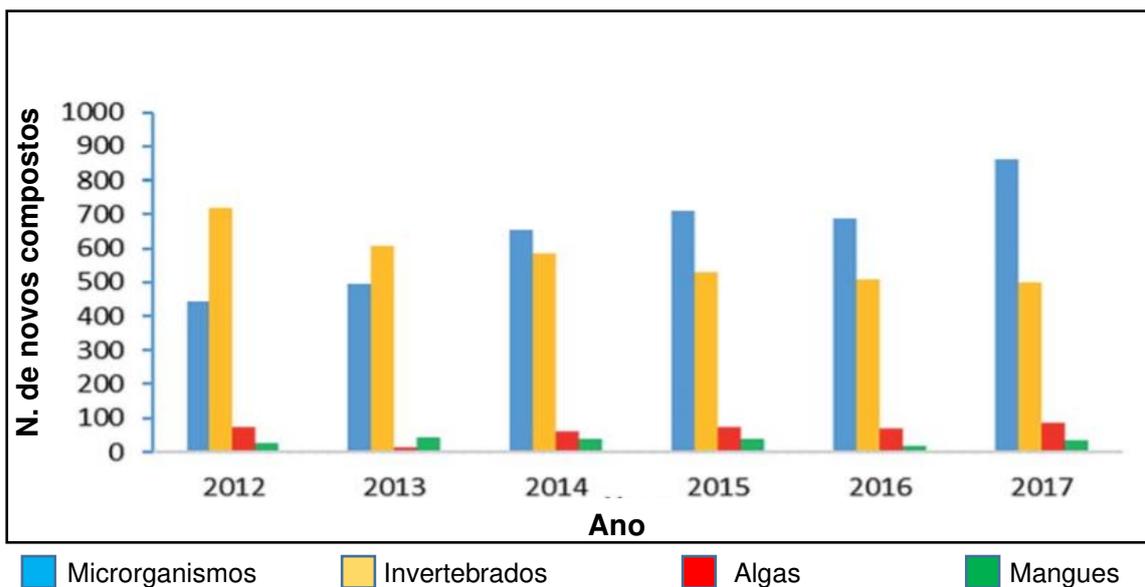
Figura 1. Principais áreas de aplicação dos compostos obtidos de organismos marinhos no período de 1996-2016.



Fonte: Adaptado de Ruiz-Torres *et al.*, 2017

Apesar da abundância de substâncias químicas produzidas pelos organismos marinhos, esta fonte foi praticamente ignorada até meados da década de 60, devido, principalmente, à dificuldade de acesso e à falta de infraestrutura necessária. Com a descoberta de novas técnicas de cultivo, manejo e extração, somado ao avanço tecnológico das últimas décadas, foi possível o desenvolvimento desse campo (Figura 2, p. 21). (Berlinck *et al.*, 2004; Costa-Lotufu *et al.*, 2009; Bernardini *et al.*, 2018)

Figura 2. Moléculas obtidos de organismos marinho no período de 2012-2017



Fonte: Adaptado de CARROLL *et al.*, 2019

Entre os inúmeros seres vivos que habitam os ecossistemas marinhos, as algas desempenham um papel primordial, sendo a base da cadeia alimentar e principal produtor de oxigênio nos mares e oceanos (Sahoo; Seckbach, 2015). As algas possuem inúmeras aplicações, principalmente para as indústrias alimentícia, cosmética, farmacêutica e de energia (Øverland; Mydland; Skrede, 2019). Em termos de classificação, as algas podem ser divididas em macroalgas e microalgas ou cianofíceas. As macroalgas são representadas majoritariamente por três classes: as *Rhodophyceae* (algas vermelhas), *Phaeophyceae* (algas pardas) e *Chlorophyceae* (algas verdes). (Lee, 2008)

As algas pardas ou castanhas (*Phaeophyceae*) representam um grupo de organismos multicelulares diversificados, geralmente encontrados no *habitat* marinho e representado por cerca de 1800 espécies agrupados em 285 gêneros (Silberfeld, 2010). Sua coloração se deve a presença de pigmentos como a fucoxantina, diatoxantina, violaxantina, clorofila A, C1, C2 e  $\beta$ -caroteno.

As algas pardas se destacam por possuírem uma química rica em substâncias com estrutura altamente diversificadas, com destaque para os policetídeos e os terpenoides (Carroll *et al.*, 2019) os quais apresentam inúmeras propriedades biológicas e farmacológicas, tais como: atividade citotóxica, antitumoral, antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica, antiviral, hepatoprotetora, nematicida, antipredatória, algicida, dentre outras. (El Gamal, 2008; Sousa *et al.*, 2017)

A família Dictyotaceae compreende cerca de 41 gêneros com aproximadamente 297 espécies, distribuídas principalmente nas regiões costeiras das zonas tropicais e subtropicais (Guiry; Guiry, 2019), sendo responsável por mais de um terço de todos os novos metabólitos secundários, isolados principalmente a partir das algas pardas. Em geral, os organismos desta família produzem policetideos estruturalmente diversificados, apresentando inúmeras atividades, principalmente antimicrobiana, anti-inflamatória e citotóxica. (Da Gama; Plouguerné; Pereira, 2014)

## **1.2. Objetivo Geral**

O presente trabalho tem como objetivo realizar um estudo interdisciplinar envolvendo as áreas de Química e Farmacologia, onde serão estudadas espécies de algas coletadas ao longo do litoral oeste do estado do Ceará, em busca de isolar e caracterizar novos metabólitos com potencial biológico.

### **1.2.1. Objetivos específicos**

Selecionar, através de um *screening* farmacológico, os extratos orgânicos das espécies que apresentarem os melhores resultados;

Investigar a composição química de exemplares de algas pardas *Lobophora variegata*, *Dictyota menstrualis* e *Dictyota mertensii*;

Caracterizar os metabólitos (novos ou não) obtidos a partir dos extratos investigados;

Testar as atividades antimicrobianas, citotóxicas e anti-inflamatório dos metabólitos isolados;

## **1.3. Detalhamento estrutural do trabalho**

Assim, neste trabalho é descrito o estudo químico de três espécies de algas pardas da família Dictyotaceae, o qual será dividido em quatro capítulos. No primeiro capítulo será realizado uma breve introdução sobre a relevância das algas para os ecossistemas marinhos, assim como sua contribuição para a pesquisa científica. O segundo capítulo abordará os aspectos relacionados a seleção das espécies de algas

para o trabalho através de um *screening* farmacológico. O terceiro capítulo abordará os aspectos de isolamento, caracterização e atividades farmacológicas da alga parda *Lobophora variegata*, precedido de breve levantamento bibliográfico sobre o gênero *Lobophora*. No quarto capítulo será abordado o estudo químico e farmacológico das algas pardas do gênero *Dictyota* (*D. menstrualis* e *D. mertensii*), juntamente com um breve levantamento do estado da arte do gênero.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fitoquímica de Plantas Medicinais – LAFIPLAM, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, em parceria com os grupos de farmacologia do Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha – LaBBMaR, situado no Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos - NPDM (UFC); Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará e Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC, Universidade Federal do Piauí.

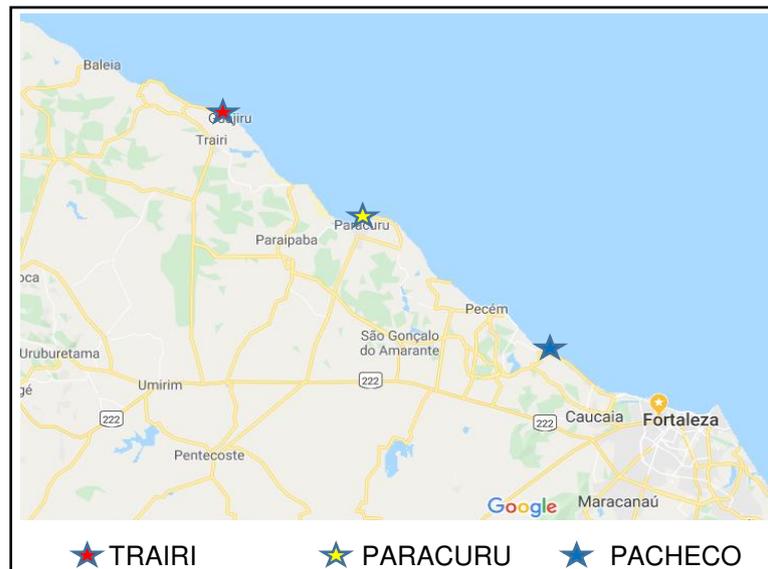
## **2. TRIAGEM DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DAS ALGAS COLETADAS NO LITORAL OESTE CEARENSE.**

### **2.1. Seleção do material biológico**

No decorrer dos anos de 2015-2017, foram realizadas coletas em quatro praias do litoral oeste do estado do Ceará. As coletas foram acompanhadas pelo Dr. Pedro Bastos Macedo Carneiro, na época técnico responsável pelo Herbário Professora Francisca Pinheiro (HMAR), no Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR. A seleção dos locais de coleta se baseou na abundância de espécies, sendo:

- Praia do Guajiru, município de Trairi 3° 16' 39" S, 39° 16' 11" W (1 coleta)
- Praia de Flecheiras, município de Trairi 3° 13' S; 39° 16' 12" W (2 coletas)
- Praia da Pedra rachada, município de Paracuru 3° 23' 55.6" S, 39° 00' 47.5 "W (4 coletas)
- Praia do Pacheco, município de Caucaia 3° 44' 4" S, 38° 39' 23" W (2 coletas).

Figura 03. Locais de coleta das espécies de algas



Fonte: Adaptado de: Google Maps: <<https://www.google.com.br/maps/@-3.4057053,-38.77566,9.62z>>

No total, 31 espécies foram coletadas, envolvendo algas das três classes, sendo: 18 algas vermelhas, 7 algas verdes e 6 algas pardas, como sumarizados na Tabela 01.

Tabela 01. Lista de algas coletadas no litoral oeste do estado do Ceará

<b>Espécies</b>	<b>Filo (Alga)</b>	<b>Família</b>	<b>Local de Coleta</b>
<i>Amansia multifida</i>	Rhodophyta	Rhodomelaceae	Guajiru/ Pacheco
<i>Boctriocla diella occidentalis</i>	Rhodophyta	Rhodomelaceae	Pacheco
<i>Bryothamnion triquetum</i>	Rhodophyta	Rhodomelaceae	Paracuru
<i>Centroceras gasparini</i>	Rhodophyta	Ceramiales	Paracuru
<i>Corallina officinalis</i>	Rhodophyta	Corallinales	Pacheco
<i>Cryptonemia crenulata</i>	Rhodophyta	<u>Halymeniaceae</u>	Pacheco
<i>Digenia simplex</i>	Rhodophyta	Rhodomelaceae	Pacheco
<i>Gelidium coarctatum</i>	Rhodophyta	Gelidiales	Paracuru
<i>Gracilaria caudata</i>	Rhodophyta	Gracilariaceae	Paracuru
<i>Gracilaria cervicornis</i>	Rhodophyta	Gracilariaceae	Paracuru/ Pacheco
<i>Gracilaria curtissae</i>	Rhodophyta	Gracilariaceae	Pacheco
<i>Gracilaria dominguensis</i>	Rhodophyta	Gracilariaceae	Paracuru/ Flecheiras
<i>Gracilaria ornata</i>	Rhodophyta	Gracilariaceae	Pacheco

<i>Halyhenia ouchassingi</i>	Rhodophyta	Halymeniaceae	Paracuru
<i>Hydropuntia cornea</i>	Rhodophyta	Gracilariaceae	Pacheco
<i>Hypnea musciformis</i>	Rhodophyta	Cystocloniaceae	Paracuru/ Pacheco
<i>Ochtodes secundiramea</i>	Rhodophyta	Rhizophyllidaceae	Paracuru
<i>Pterocladia beachiae</i>	Rhodophyta	Pterocladaceae	Paracuru
<i>Caulerpa cupressoides</i>	Chlorophyta	Caulerpaceae	Guajiru/ Paracuru
<i>Caulerpa mexicana</i>	Chlorophyta	Caulerpaceae	Paracuru
<i>Caulerpa prolifera</i>	Chlorophyta	Caulerpaceae	Guajiru/Pacheco
<i>Caulerpa racemosa</i>	Chlorophyta	Caulerpaceae	Pacheco
<i>Cladophora</i> sp	Chlorophyta	Cladophoraceae	Flecheiras /Guajiru
<i>Sargassum</i> sp	Chlorophyta	Sargassaceae	Paracuru/ Pacheco
<i>Valonia aegagropila</i>	Chlorophyta	Valoniaceae	Pacheco
<i>Colpomenia sinuosa</i>	Phaeophyta	Dictyotaceae	Paracuru
<i>Dictyosphaeria cavernosa</i>	Phaeophyta	Dictyotaceae	Flecheiras
<i>Dictyota menstrualis</i>	Phaeophyta	Dictyotaceae	Pacheco/Paracuru
<i>Dictyota mertensii</i>	Phaeophyta	Dictyotaceae	Flecheiras
<i>Lobophora variegata</i>	Phaeophyta	Dictyotaceae	Paracuru/ Pacheco
<i>Padina gymnospora</i>	Phaeophyta	Dictyotaceae	Paracuru

---

Fonte: dados do autor

## 2.2. Triagem dos extratos orgânicos

Após a coleta e identificação das espécies, foi realizado o preparo dos extratos orgânicos utilizando os solventes hexano, acetato de etila e etanol (subitem 3.4, p. 33). Os extratos resultantes foram submetidos às seguintes triagens:

Teste de inibição do crescimento bacteriano frente às linhagens de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, realizado no Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia – BIOTEC (UFPI), sob a supervisão do professor Dr. José Delano B. Marinho Filho.

Teste de inibição do crescimento celular da linha HCT-116 (câncer de próstata), realizado no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia Marinha – LaBBMaR, sob a supervisão do prof. Dr. Diego Veras Wilke.

Os extratos das algas que apresentaram os melhores resultados na triagem foram selecionados para os estudos posteriores. Foi considerado ativo o extrato que apresentaram: Inibição do crescimento bacteriano (CIM) igual ou inferior a 200 µg/mL nos ensaios contra as cepas bacterianas de *S. aureus* e *E. coli*. Inibição do crescimento celular (%) da linhagem de células cancerígenas de próstata (HCT-116) nas concentrações de 75 µg/mL e 5 µg/mL.

Dentre os extratos testados, apenas três (03) foram ativos no ensaio de inibição do crescimento bacteriano, ambos contra as cepas bacterianas de *S. aureus*. Para os ensaios de citotoxicidade trinta e cinco (35) extratos foram ativos em pelo menos uma das concentrações testadas.

Com base nas atividades exibidas, os extratos selecionados para a investigação química foram das algas *L. variegata*, *D. menstrualis* e *D. mertensii*.

Tabela 02. Relação das algas cujos extratos mostraram atividade

Lista de Espécies	Sigla Extrato	Citotóxico		Antimicrobiano	
		% Inibição (HCT-116)		CIM	
		5 µg	75 µg	<i>S. aureus</i> (µg/mL)	<i>E. coli</i> (µg/mL)
<i>Caulerpa cupressoides</i>	H	-	100	-	-
<i>C. prolifera</i>	A	100	100	-	-
	H	83,8	97,4	-	-
	E	-	92,8	-	-
	H	-	83,0	-	-
<i>C. racemosa</i>	A	-	97,0	-	-
	E	-	78,92	-	-
<i>Cladophora sp</i>	A	90,7	93,6	-	-
	E	-	85,6	-	-
<i>Corallina officinalis</i>	H	-	-	200	-
<i>Cryptonemia crenulata</i>	H	-	95,6	-	-
	A	74	86,6	-	-
	E	-	100	-	-
<i>Dictyosphaeria cavernosa</i>	A	-	91,7	-	-
	E	-	55,6	-	-
<b><i>Dictyota menstrualis</i></b>	H	85,0	90,1	-	-
	A	72,4	90,3	200	-

<b><i>D. mertensii</i></b>	H	83, 5	100	-	-
	A	54, 0	100	-	-
<i>Gelidium coarctatum</i>	E	-	80,0	-	-
	H	-	76,0	-	-
<i>Gracilaria caudata</i>	H	70, 0	100	-	-
	A	75	100	-	-
<i>G. cervicornis</i>	A	-	70,0	-	-
<i>G. curtissae</i>	H	-	81,0	-	-
<i>G. dominguensis</i>	H	-	100	-	-
	A	65, 0	100	-	-
<i>G. ornata</i>	H	-	-	200	-
	A	70	96,0	-	-
<b><i>Lobophora variegata</i></b>	H	100	100	-	-
	A	54, 5	100	-	-
	E	80	100	-	-

Legenda: H (hexano); A (acetato de etila); E (etanol)

### 3. ***LOBOPHORA VARIEGATA*: aspectos gerais, estudo químico e investigação farmacológico dos compostos**

#### 3.1. Introdução

O gênero *Lobophora* (J. Agardh), pertencente à família Dictyotaceae (Phaeophyceae), compreende cerca de 22 espécies, distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais do globo, sendo um componente fundamental de recifes de corais. Os principais metabólitos encontrados no gênero são os terpenóides, policetideos e derivados fenólicos, os quais despertam interesse da indústria farmacêutica devido às suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais. (Moo-Puc *et al.*, 2009; Sathyaseelan *et al.*, 2015)

*Lobophora variegata* (J. V Lamouroux Womersley ex E. C. Oliveira) é a espécie mais representativa do gênero *Lobophora* e a única espécie conhecida no oeste do oceano atlântico até o ano de 2015. Nesse período, Schultz *et al.* (2015), realizou um levantamento taxonômico, no qual englobou novas técnicas de classificação baseadas nos dados genômicas de inúmeros espécimes coletadas no mar do Caribe, sendo identificado quatro novas espécies (*L. declerckii*, *L.*

*guadeloupensis*, *L. littlerorum*, *L. payriae*), antes classificadas erroneamente como *L. variegata*. No Brasil não há relatos de outras espécies pertencentes ao gênero, principalmente por falta de estudos taxonômicos que utilizem ferramentas modernas e parâmetros mais precisos de classificação.

Espécies do gênero *Lobophora* são produtoras de compostos de natureza policetídica, como verificado nos trabalhos de Gutiérrez-Cepeda *et al.* (2015) e Vieira *et al.* (2017) que isolaram uma série de compostos policetideos das espécies *L. variegata* e *L. rosácea*, ambas coletadas em águas profundas (15-30 m), os quais foram nomeados como lobophorenóis, lobophorols ou lobophorenonas, em alusão ao gênero (Figura 6, p. 32). Os compostos obtidos por Gutiérrez-Cepeda (2015) apresentaram propriedades antimicrobianas, enquanto os compostos obtidos por Vieira (2017) apresentaram propriedades aleloquímicos. A possibilidade de descoberta de novas propriedades farmacológicas aliado ao resultado obtido a partir do *screening* realizado despertam o interesse pelo estudo da alga pertencente à *L. variegata*.

Diante do que foi exposto, este trabalho tem como objetivo contribuir com o conhecimento químico e farmacológico da alga parda *L. variegata* coletada na costa cearense, através da investigação de sua composição química e prospecção farmacológica.

### **3.2. Considerações ecológicas sobre a espécie *L. Variegata***

As algas da classe das Phaeophytas estão entre as mais representativas dentre as algas marinhas. A classe é composta por cerca de 285 gêneros que habitam tanto o ecossistema marinho quanto rios e lagos, sendo as Ectocarpales (700), Fucales (524), Dictyotaceae (297) e Laminariaceae (130) as principais famílias que compõem esta classe (GUIRY; GUIRY, 2019; SAHOO; SECKBACH, 2015).

A Família Dictyotaceae é composta exclusivamente por algas marinhas de coloração castanha e constituem os principais componentes dos recifes de corais, sendo um dos principais gêneros, o *Lobophora*. (Guiry; Guiry, 2019)

O gênero *Lobophora* é representado majoritariamente pela espécie *L. variegata* (*Sinônimos: Dictyota variegata, Zonária variegata*), amplamente encontrada nas regiões tropicais e subtropicais do globo. Existem muitas incertezas quanto à

classificação do gênero, pois acredita-se que existem várias espécies distintas classificadas erroneamente e inseridas em outros gêneros. *Lobophora variegata* apresenta a seguinte classificação sistemática simplificada:

- **Reino:** *Cromista*
- **Filo:** *Ochrophyta*
- **Classe:** *Phaeophyceae*
- **Ordem:** *Dictyotales*
- **Família:** *Dictyotaceae*
- **Gênero:** *Lobophora*
- **Espécie:** *variegata*

Quanto a sua estrutura morfológica, *L. variegata* apresenta as seguintes características. (Abbas; Shameel, 2010; Schultz *et al.*, 2015)

- **Porção inferior:** Talos eretos, de coloração marrom escuro a castanho em forma laminar ou ondulares geralmente fixados por pequenas pseudo-raízes compactas, medindo de 3-6 mm de comprimento e 2-4 mm de diâmetro.

- **Porção superior:** Talos contendo de 8-9 camadas, semelhante a pétalas de rosas ou pequenas lâminas (Figura 4, p. 30).

Figura 4. *L. variegata*, vista pela porção superior



Fonte: Adaptado do arquivo pessoal pertencente ao Dr. Pedro Bastos M. Carneiro (LABOMAR - UFC)

### 3.3. Revisão Bibliográfica do gênero *Lobophora*

Embora o gênero *Lobophora* seja um dos mais importantes dentro da família Dictyotaceae, suas espécies permanecem pouco exploradas pela comunidade científica, tendo sido publicados 172 artigos, abrangendo estudos biológicos, químicos ou áreas afins. *L. variegata* tem se mostrado a mais importante, com 112 artigos publicados abordando aplicações biológicas e farmacológicas de seus extratos, a relação ecológica da espécie com seu ecossistema, além do isolamento e caracterização dos seus constituintes químicos (Figura 5, p. 31).

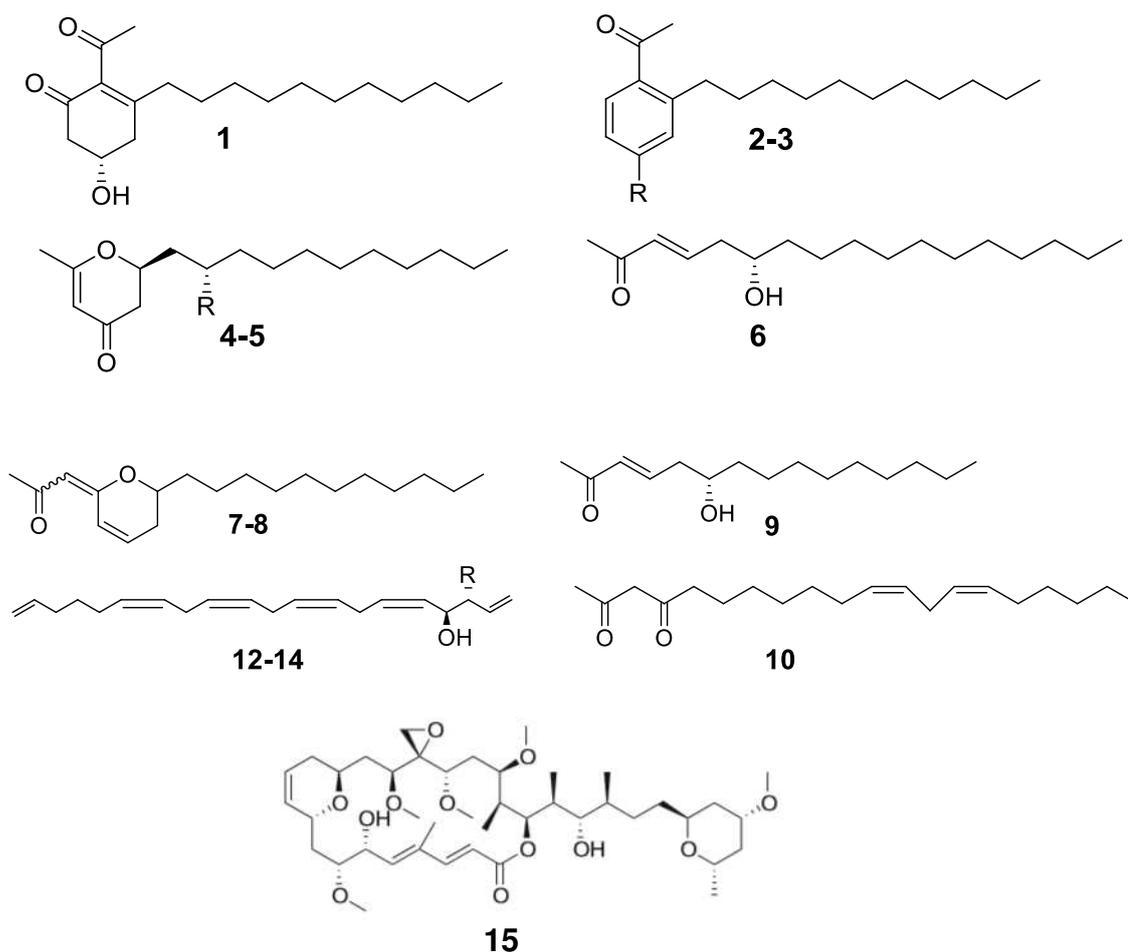
Figura 5. Número de publicações para a espécie *L. variegata*



Fonte: <https://scifinder.cas.org>

Em levantamento referente ao isolamento, verificou-se apenas seis trabalhos, sendo obtidos 23 compostos, dos quais dez são policetideos (**1-10**), três são álcoois poli-insaturados (**12-14**), uma macrolactona (**15**), três são ácidos graxos, três sulfolípidos, um derivado de tocoferol e um polissacarídeo sulfatado, como mostrado na figura 6 (p. 32).

Figura 06. Representação estrutural dos compostos obtidos de espécies do gênero



Fonte: Dados do autor

### 3.4. Estudo do material biológico de *L. variegata*

#### 3.4.1. Coleta, preparação dos extratos e perfil cromatográfico

*Lobophora variegata* foi coletado no período de maré-baixa, em março de 2015, na praia da Pedra Rachada (03°23'S; 39°54'O), no município de Paracuru e na praia do Pacheco (03°44'S; 38°39' O), no município de Caucaia, localizados no litoral oeste do estado do Ceará (Figura 7, p. 33). A exsicata foi preparada e identificada pelo Dr. Pedro Bastos de M. Carneiro e encontra-se depositado no Herbário Profa. Francisca Pinheiro (HMAR), no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), sob o número HMAR 2997.

Figura 7. Locais de coleta de *L. variegata* no litoral cearense



Fonte: Próprio autor

O material biológico de *L. variegata* (aprox. 12,0 kg peso fresco) foi lavado abundantemente com água corrente, seguido por água destilada e seca a temperatura ambiente por três (03) dias. Após esse período, o material seco (1,4 Kg) foi triturado e submetido a sucessivas extrações com os solventes orgânicos hexano (3X), AcOEt (3X) e EtOH (2X), resultando nos respectivos extratos. Os extratos hexânico (4,20 g) e AcOEt (18,00 g) foram submetidos a diversos fracionamentos cromatográficos, incluindo cromatografia em coluna (CC), sephadex LH-20 e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

#### 3.4.1.1. Fracionamentos cromatográficos do extrato hexânico de *L. variegata*

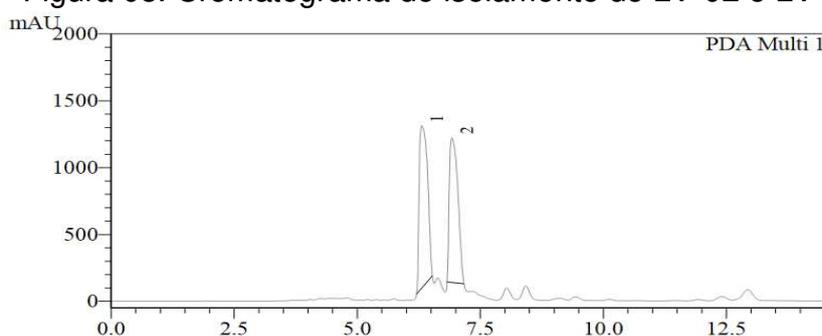
O extrato hexânico de *L. variegata* (4,20 g), codificado como EHLV, foi submetido a um fracionamento cromatográfico em gel de sílica, utilizando a mistura binária de hexano e AcOEt, resultando em sete (07) frações de 300,0 mL cada (Fluxograma 1, p. 35).

A fração A (206,0 mg) foi submetida a cromatografia em coluna aberta, utilizando a mistura de éter de petróleo e hexano como fase móvel, nas proporções de 10:0; 8:2; 6:4; 0:10, obtendo-se um total de 62 subfrações. Estas subfrações, após analisadas por CCD, foram reunidas em 5 grupos (AA-AF) de acordo com suas semelhanças de *Rf*. A subfração AF (6,0 mg) apresentou-se na forma de um filme de

cor alaranjado intenso, de pureza satisfatória, sendo codificado como LV-01 (Fluxograma 1, p. 35).

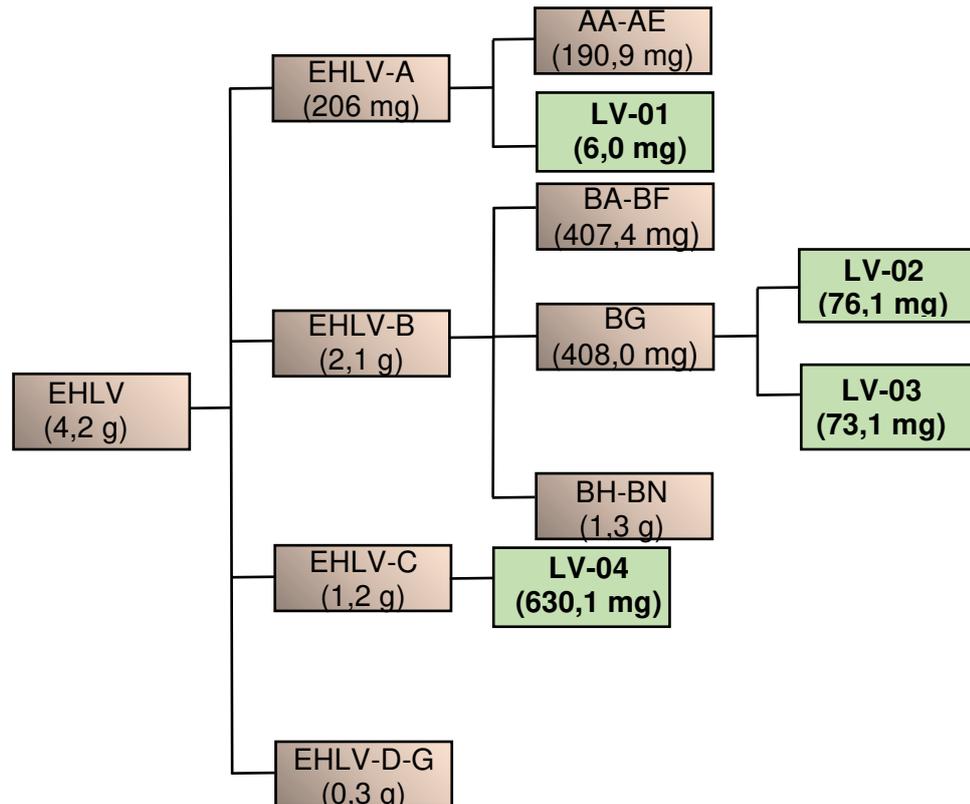
A fração B (2,16 g) foi submetida a coluna cromatográfica aberta, utilizando a mistura de Hexano e AcOEt nas seguintes razões volumétricas: 100:0; 98:2; 96:4; 94:6; 0:100, resultando em 42 subfrações que após análise por CCD, resultou em 14 grupos (BA-BN). A subfração EHLV-BG foi analisada e isolada em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), como descrito no método 1 da parte experimental, seção 5.1.4. (p. 129), resultando em dois picos, LV-02 (76,1 mg; Rt 6,3 min) e LV-03 (73,1 mg; Rt 6,75 min) (Fluxograma 1, p. 35; Figura 8, p. 34).

Figura 08. Cromatograma de isolamento de LV-02 e LV-03



Fonte: Dados do autor

A fração C (1,28 g) foi submetida a um fracionamento cromatográfico a vácuo utilizando funil poroso e os solventes hexano e acetato de etila em gradiente de polaridade, nas seguintes proporções: 100:0; 95:5; 90:10; 50:50; 0:100, resultando em 10 subfrações de 100 mL cada (EHLV-CA- EHLV-CJ). As subfrações EHLV-CD (88,9 mg), CE (508, 0 mg) e CF (229, 1 mg) foram precipitadas separadamente e filtradas, utilizando metanol como solvente e papel de filtro poroso, resultando em um sólido amorfo (720,1 mg). Este por sua vez, foi dissolvido em acetona, levemente aquecida e deixado em repouso por 48 horas, resultando em um composto (630 mg) codificado como LV-04.

Fluxograma 1. Metodologia de fracionamento do extrato hexânico de *L. variegata*

Fonte: Dados do autor

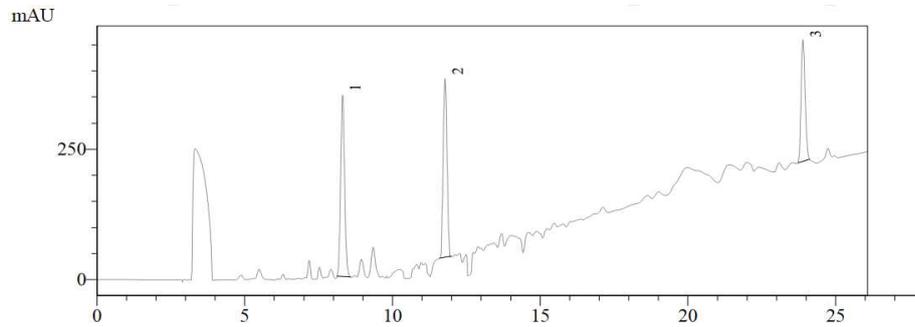
### 3.4.1.2. Fracionamentos cromatográficos do extrato acetato de etila de *Lobophora variegata*

O extrato acetato de etila de *L. variegata* (18,0 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica filtrante a vácuo em sílica utilizando funil poroso, tendo hexano, acetato de etila e metanol, como solventes, resultando em sete (07) frações de 400,0 mL cada, (Fluxograma 2, p. 37).

A fração EALV-C (4,61 g) foi submetido a uma coluna cromatográfica sob gel de sílica, utilizando hexano e acetato de etila como fase móvel, em gradiente de polaridade, iniciando em hexano puro, seguido de acréscimo de 10% de acetato até mistura equimolar (1:1), finalizando com acetato puro. Desse fracionamento, obteve-se sete subfrações (EALV-CA a EALV-CG) de 200,0 mL cada. A subfração EALV-CE (513,7 mg) foi dissolvida em diclorometano/metanol 1:9 e cromatografia em coluna contendo Sephadex LH-20, obtendo 41 subfrações de cada 5,0 mL cada. Estas frações foram analisadas por CCD, resultando em cinco (05) grupos de frações (EALV-CEA-CEE).

A subfração EALC-CEC (135,2 mg) foi purificada por CLAE, descrito no método 2 da parte experimental, seção 5.1.4. (p. 129), resultando na obtenção de 10 picos (Figura 09, p. 36), dos quais, apenas os picos 1 (5,4 mg, Rt 8,3 min), 4 (1,9 mg, Rt 11,7 min) e 10 (9,7 mg, Rt 23,8 min) apresentaram pureza satisfatória, sendo codificados como: LV-05, LV-06 e LV-07, respectivamente.

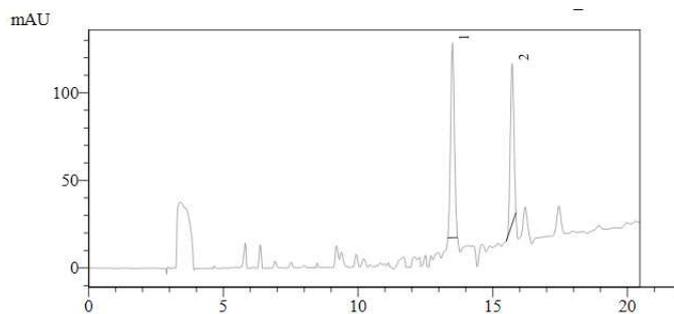
Figura 09. Cromatograma de isolamento de LV-05, LV-06 e LV-07



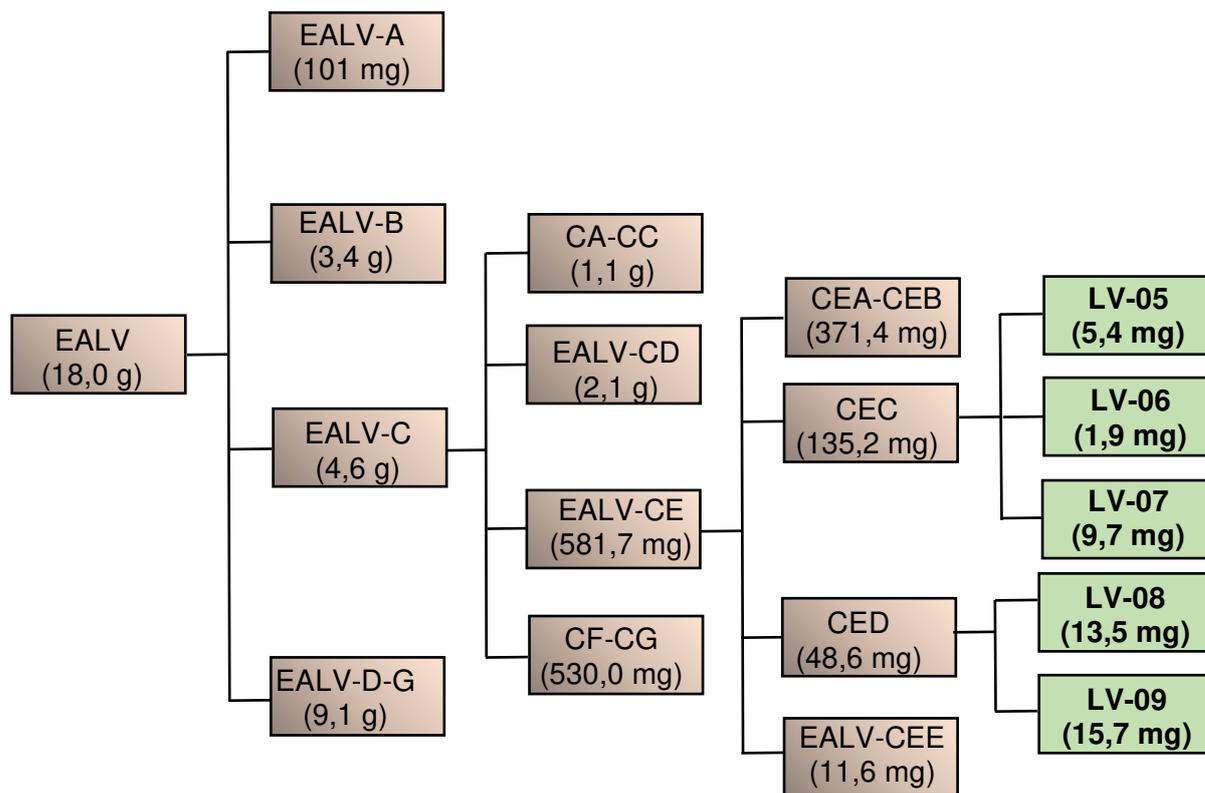
Fonte: Dados do autor

A subfração EALC-CED (48,6 mg) também foi purificada em CLAE, conforme descrito no método 2 da parte experimental, seção 5.1.4. (p. 129), resultando na obtenção de 2 picos (Figura 10, p. 37), sendo o pico 1 (11,5 mg, Rt 13,5 min) e o pico 2 (13,5 mg, Rt 15,7 min), codificados como LV-08 e LV-09.

Figura 10. Cromatograma de isolamento de LV-08 e LV-09



Fonte: Dados do autor

Fluxograma 02. Metodologia de fracionamento do extrato hexânico de *L. variegata*

Fonte: Dados do autor

### 3.5. Resultados e Discussão

#### 3.5.1. Determinações estruturais

##### 3.5.1.1. Determinação estrutural dos compostos obtidos do extrato hexânico de *Lobophora variegata*

O fracionamento cromatográfico do extrato hexânico da alga parda *L. variegata* resultou em sete (07) frações denominadas de A-G (p. 37). As frações A (0,2 g), B (2,1 g) e C (1,2 g), após análises em CCD se mostraram mais promissoras e foram submetidas a uma série de fracionamentos cromatográficos em gel de sílica e CLAE, resultando no isolamento e caracterização de 04 compostos (seção 3.4.1.1, p. 34), cujas determinações serão descritas a seguir.

##### 3.5.1.1.1. Determinação estrutural de LV-01

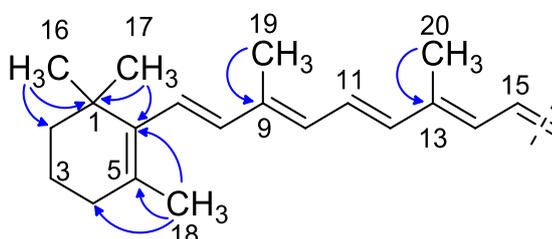
O fracionamento cromatográfico da fração A (0,2 g) culminou no isolamento de 6,0 mg de um pigmento de cor laranja-avermelhado intenso,  $[\alpha]_D^{21} +106,03^\circ$ , (c 0,09 em  $\text{CHCl}_3$ ), nomeado como LV-01 (subitem 3.4.1.1., p. 34).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) de LV-01 (Apêndice A1) apresentou quatro sinais correspondentes a hidrogênios olefínicos em  $\delta_H$  6,70 (1H-m); 6,66 (m); 6,35 (d,  $J=14,9$  Hz) e 6,15 (m), assim como sinais para hidrogênios ligados a carbonos metílicos em  $\delta_C$  1,97 (s); 1,72 (s); 1,26 (s) e 1,03 (s).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  BB ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz, Apêndice A2), apresentou 20 linhas espectrais correspondentes a carbonos olefínicos e insaturados. A análise detalhada dos deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e comparação com dados obtidos da literatura acerca do gênero *Lobophora*, sugerem que o composto em estudo seja o  $\beta$ -caroteno (Figura 12, p. 39). Os carotenoides são bastante comuns em algas pardas, sendo os pigmentos responsáveis por sua coloração. (Vieira *et al.*, 2017)

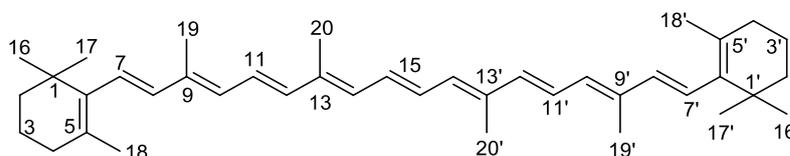
O espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (Apêndice A3) mostrou correlações a  $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$  com destaque para os hidrogênios ligados a carbonos metílicos em  $\delta_H$  1,26 (s, 3H-16), 1,03 (s, 3H-17) e 1,72 (s, 3H-18) com os carbonos em  $\delta_C$  34,5 (C-1), 39,9 (C-2), 34,5 (C-4), 129,5 (C-5) e 138,1 (C-6) corroborando com a proposta estrutural verificado na figura 11 (p. 39). O  $\beta$ -caroteno é um carotenoide largamente encontrado em frutas, legumes, plantas de grande porte e em vários gêneros de algas vermelhas e pardas. (CARDOZO *et al.*, 2007)

Figura 11. Principais correlações observadas para DM-01



Fonte: Dados do autor

Figura 12. Representação estrutural de LV-01



Fonte: Dados do autor

Tabela 03. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para LV-01 ( $\text{CDCl}_3$ , 300)

HSQC			Literatura*	
C	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. (J em Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$ mult. (J Hz)
1/1'	34,5	-	34,4	-
2/2'	39,9	1,49 (m)	39,8	1,50 (m)
3/3'	19,5	1,62 (m)	19,4	1,62 (m)
4/4'	33,3	2,03 (m)	33,2	2,03 (m)
5/5'	129,5	-	129,3	-
6/6'	138,1	-	138,0	-
7/7'	126,9	6,15 (sl)	126,7	6,17 (s)
8/8'	137,9	6,15 (m)	137,8	6,17 (s)
9/9'	136,2	-	136,0	-
10/10	131,0	6,15 (m)	130,8	6,17 (d, $J=12$ )
11/11'	125,2	6,70 (m)	125,1	6,67(dd, $J=15$ ; 11)
12/12'	137,4	6,35 (d, $J=14,9$ )	137,3	6,36(d, $J=15$ )
13/13'	136,6	-	136,4	-
14/14'	132,6	-	132,4	6,27 (m)
15/15'	130,2	6,64 (m)	130,0	6,62(dd, $J=15$ ; 11)
16/16'	29,9	1,26 (s)	29,0	1,03 (s)
17/1	29,2	1,03 (s)	29,0	1,03 (s)
18/18'	21,9	1,72 (s)	21,7	1,72 (s)
19/19'	12,9	1,97 (s)	12,8	1,98 (s)
20/20'	13,0	1,97 (s)	12,8	1,98 (s)

Fonte: Dados do autor

\* Tsukida; Saiki; Sugiura, 1981

## 3.5.1.1.2. Determinação Estrutural de LV-02

O composto nomeado como LV-02 foi isolado na forma de um óleo de coloração amarela, apresentando  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -18,06^\circ$  (c. 0,09  $\text{CHCl}_3$ ) e absorção no ultravioleta DAD-( $\text{UV}_{\lambda_{\text{max}}}$ ) de 202 nm em acetonitrila (Apêndice B1-a).

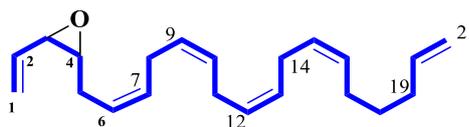
A fórmula molecular foi determinada pelo espectro de massas de alta resolução (EMAR), utilizando a técnica de ionização por *electrospray* (ESI), o qual mostrou o pico referente a molécula protonada ( $[M + H]^+$ ) em  $m/z$  299,0093 (calculada 299,0096; erro -2,76 ppm), indicando a fórmula molecular  $C_{21}H_{30}O$ , a qual apresenta índice de deficiência de hidrogênio (IDH) igual a sete (07).

O espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz) de LV-02 (Apêndice B2), apresentou sinais na faixa de  $\delta_H$  5,75 - 4,96 ppm correspondente a hidrogênios ligados a carbonos olefínicos, sinais em  $\delta_H$  3,44 e 3,10 ppm para hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, bem como sinais em  $\delta_H$  2,85 e 2,09 ppm correspondentes a hidrogênios metilênicos alílicos como observados para compostos de cadeia longa contendo duplas ligações alternadas, semelhante aos ácidos graxos do tipo ômega-3 e ômega-6 (Dexy; Chakraborty, 2017). Em uma análise mais detalhada, os sinais em  $\delta_H$  5,08 (dd,  $J = 17,1; 1,8$  Hz) e 4,96 (dd,  $J = 10,1; 2,0$  Hz) indicaram a presença de hidrogênios vinílicos terminais, enquanto os sinais em  $\delta_H$  3,44 (dd,  $J = 7,1; 4,4$  Hz) e 3,10 (td,  $J = 6,4; 4,3$  Hz) foram compatíveis para hidrogênios de éteres cíclicos, mais especificamente de oxirano. (Fontana *et al.*, 2007)

O espectro de RMN  $^{13}C$  BB ( $CDCl_3$ , 125 MHz) de LV-02 (Apêndice B3), apresentou 20 linhas espectrais, cuja análise dos espectros de RMN  $^{13}C$  APT (Apêndice B4) e HSQC (Apêndice B5) permitiu definir o padrão de hidrogenação da molécula como tendo doze carbonos metínicos, dos quais dez são  $sp^2$ , dois são  $sp^3$  oxigenados, e nove carbonos metilênicos. No espectro HSQC, os sinais em  $\delta_C$  120,6 e 114,7 revelaram acoplamentos com os sinais em  $\delta_H$  5,51/5,38 e 5,02/4,96 indicando dois sistemas vinílicos terminais, como diagnosticado no espectro de RMN  $^1H$ . Importante destacar que o espectro de HSQC também foi importante para correlacionar os hidrogênios diastereotópicos 2,41 (H-5a) e 2,21 (H-5b) ao sinal de carbono alílico 26,4 (C-5), bem como os sinais de hidrogênios metilênicos em 3,44 (H-3) e 3,10 (H-4) com os sinais em  $\delta_C$  57,2 e 58,1 de um anel oxirano. O sinal em  $\delta_C$  25,8 apresentou o dobro da intensidade dos demais sinais, tendo sido, portanto, associado a dois carbonos metilênicos, acrescentando mais um carbono à estrutura.

A análise do espectro RMN 2D  $^1H$ ,  $^1H$  COSY (Apêndice B6), apresentou uma sequência de sinais que corroboram com a proposta estrutural de LV-02, com destaque para os hidrogênios de um grupo vinil-oxirano (2H-1 a H-4) com os hidrogênios metilênicos alílicos 2H-5, como mostrado na figura 13 (p. 41).

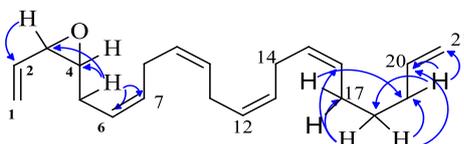
Figura 13. Proposta estrutural de LV-02 com base no espectro COSY



Fonte: Dados do autor

A análise do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (Apêndice B7) confirmou a presença do grupo vinil-oxirano através das correlações dos hidrogênios diastereotópicos  $\delta_{\text{H}}$  2,45 (m, H-5b) e 2,24 (m, H-5a) com os carbonos C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  57,2), C-4 ( $\delta_{\text{C}}$  58,1), C-6 ( $\delta_{\text{C}}$  124,3) e C-7 ( $\delta_{\text{C}}$  130,9), bem como do hidrogênio vinílico  $\delta_{\text{H}}$  5,75 (m, H-2) com os carbonos C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  120,2) e C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  57,2). Já as correlações entre os hidrogênios metílicos em  $\delta_{\text{H}}$  1,48 (quint, 2H-18,  $J = 7,4$  Hz) com os carbonos C-16 ( $\delta_{\text{C}}$  130,2), C-17 ( $\delta_{\text{C}}$  26,8), C-19 ( $\delta_{\text{C}}$  33,5) e C-20 ( $\delta_{\text{C}}$  138,9) corroboram com a proposta de três grupos metilênicos e um grupo vinil terminal como observada no espectro COSY (Figura 14, p. 41).

Figura 14. Principais correlações ( $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$ ) observadas para LV-02

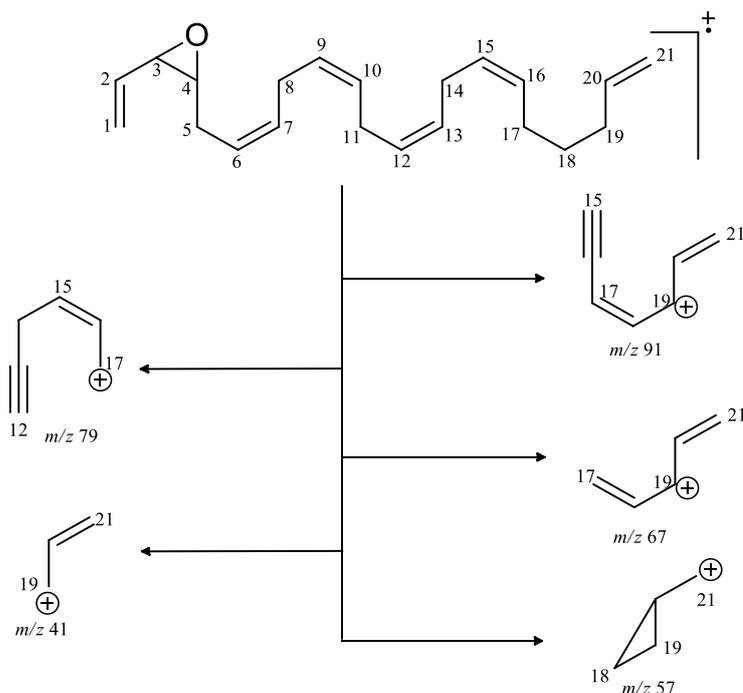


Fonte: Dados do autor

A configuração das ligações dupla foi estabelecida como *cis* baseados nos valores de deslocamentos químicos dos carbonos alílicos C-5 ( $\delta_{\text{C}}$  26,4) e C-17 ( $\delta_{\text{C}}$  26,8) e *bis*-alílicos C-8 ( $\delta_{\text{C}}$  25,8), C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  26,0) e C-14 ( $\delta_{\text{C}}$  25,8), inferiores a 28,0 ppm. Note que para as ligações dupla com configuração *trans*, os valores de deslocamentos químicos para os carbonos alílicos são superiores a 30 ppm (Zeng *et al.*, 2012).

O espectro de massas obtido por CG-EM (Apêndice B8) mostrou padrão de fragmentação em acordo com a estrutura proposta (Figura 15, p. 42).

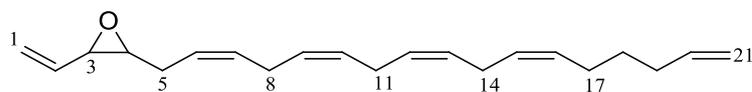
Figura 15. Proposta de fragmentação para LV-02



Fonte: Dados do autor

Em estudos recentes, Gutiérrez-Cepeda *et al.* (2015) e Vieira *et al.* (2017) isolaram uma série de compostos semelhantes a LV-02 a partir de *L. variegata*, coletada nas Ilhas Canárias (Espanha) e *L. rosácea*, coletada em Nova Caledônia (Austrália). Em ambos os estudos foram isolados policetídeos os quais foram nomeados como lobophorenois ou lobophorenos, em alusão ao gênero. Vale ressaltar que estes compostos apresentam atividades farmacológicas, tais como citotóxicas, antimicrobiana, antiviral, antifúngico, pupicida, larvicida, dentre outros, (Vieira *et al.*, 2017). Estes compostos diferem de LV-02 pela ausência do grupo epóxido em C-3 e C-4. Assim, LV-02 foi determinado como sendo um heneicosano poliinsaturado e epoxidado, nomeado como epoxi-lobophoreno A (Figura 16, p. 42), recentemente publicado (Ávila *et al.*, 2019).

Figura 16. Representação estrutural proposta para LV-02



Fonte: dados do autor

Tabela 04. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LV-02 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)

C	HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	120,6	5,51 (m); 5,38 (m)		
2	132,4	5,75 (m)	H-3	
3	57,2	3,44 (dd, $J=6,8; 4,2$ )	H-2	2H-5
4	58,1	3,10 (td, $J= 6,3; 4,2$ )	2H-5	
5	26,4	2,41 (dt, $J= 14,8; 6,5$ ) 2,21 (dt, $J= 14,8; 6,5$ )		
6	124,3	5,45 (m)	2H-5	
7	130,9	5,48 (m)		2H-5
8	25,8	2,85 (m)		
9	128,7	5,38 (m)		
10	128,7	5,38 (m)		
11	26,0	2,85 (m)		
12	128,1	5,38 (m)		
13	128,0	5,38 (m)		
14	25,8	2,85 (m)		
15	127,9	5,38 (m)		
16	130,2	5,38 (m)	2H-17	2H-18
17	26,8	2,09 (m)	2H-18	
18	29,0	1,46 (qu, $J= 7,4$ )	2H-19	
19	33,5	2,08 (m)	2H-18	2H-17
20	138,9	5,75 (m)	2H-19	2H-18
21	114,7	5,02 (m); 4,96 (m)		2H-19

Fonte: Dados do autor

## 3.5.1.1.3. Determinação Estrutural de LV-03

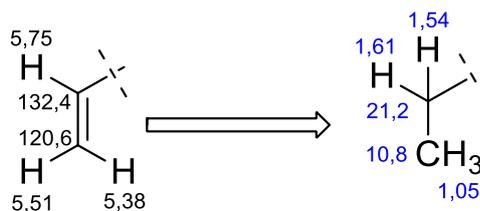
O composto codificado como LV-03 foi obtido na forma de um óleo de cor amarela, apresentando  $[\alpha]_D^{20} -16,09^\circ$  (c. 0,09  $\text{CHCl}_3$ ) e absorção no ultravioleta DAD- ( $\text{UV}_{\lambda_{\text{max}}}$ ) de 202 nm em acetonitrila (Apêndice B1-b).

O espectro de massas utilizando a técnica de ionização química à pressão atmosférica (APCI, Apêndice C6), mostrou o pico referente a molécula protonada  $[M+H]^+$  em  $m/z$  301 u.m.a., possibilitando a determinação da fórmula molecular  $C_{21}H_{32}O$ , a qual mostra IDH=06.

O espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz) de LV-03 (Apêndice C1) apresentou deslocamentos químicos semelhantes aos de LV-02, com exceção de um sinal com integração para três hidrogênios em  $\delta_H$  1,05 (t,  $J = 7,6$ Hz) e de dois sinais para hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_H$  1,62 (m) e 1,55 (m).

O espectro de RMN  $^{13}C$  BB ( $CDCl_3$ , 125 MHz) de LV-03 (Apêndice C2) apresentou 20 sinais para carbonos, com deslocamentos químicos semelhantes aos de LV-02. A análise dos espectros de RMN APT (Apêndice C3) e HSQC (Apêndice C4) definiram o padrão de hidrogenação dos carbonos, como dez carbonos metínicos, dos quais oito são  $sp^2$  e dois são  $sp^3$  oxigenados, dez carbonos metilênicos e um carbono metílico. A principal diferença observada foi a substituição de um dos grupos vinílicos terminais em LV-02 por um grupo etila, como pode ser verificado na figura 17 (p. 44) e conformado pelos fragmentos de massas (Figura 15, p. 42)

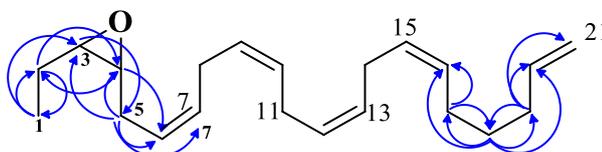
Figura 17. Deslocamentos químicos de LV-02 e LV-03



Fonte: dados do autor

A porção etil-oxirano foi confirmada no espectro de HMBC (Apêndice C5) pelas correlações entre os hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_H$  1,62 (H-2a, m) e 1,55 (H-2b, m) com os carbonos em  $\delta_C$  10,08 (C-1) e 58,5 (C-3), bem como dos sinais em  $\delta_H$  1,05 (3H-1, t,  $J = 7,6$  Hz) com  $\delta_C$  21,2 (C-2) e 58,5 (C-3), como pode ser verificado na figura 18 (p. 44).

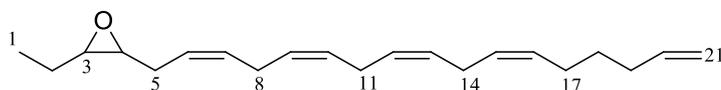
Figura 18. Principais correlações observadas no espectro HMBC de LV-03



Fonte: dados do autor

Com base nos dados espectrais, LV-03 trata-se de um composto análogo a LV-02, diferindo apenas pela hidrogenação do grupo vinil terminal em C1-C2, sendo, portanto, um novo derivado nomeado como epoxi-lobophoreno B (Figura 19).

Figura 19. Representação estrutural de LV-03



Fonte: dados do autor

Tabela 05. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LV-03 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz).

C	HSQC		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	10,8	1,05 (t, $J= 7,6$ )	2H-2	
2	21,2	1,62 (m), 1,55 (m)	3H-1	H-4
3	58,5	2,98 (dt, $J= 6,4; 4,3$ )		3H-1, 2H-5
4	56,7	2,91 (dt, $J= 6,4; 4,3$ )	2H-5	2H-2, H-6
5	26,3	2,39 (td, $J= 13,8$ ) 2,24 (td, $J= 13,8; 6,4$ )		H-3
6	124,7	5,49 (m)	2H-5, 2H-7	H-4
7	130,6	5,49 (m)		2H-5
8	25,8	2,84 (m)		
9	128,7	5,37 (m)		
10	128,6	5,37 (m)		
11	26,0	2,84 (m)		
12	128,1	5,37 (m)		
13	128,0	5,37 (m)		
14	25,8	2,84 (m)		
15	127,9	5,37 (m)		
16	130,2	5,40 (m)	2H-17	2H-18
17	26,8	2,07 (qu, $J= 6,8$ )		
18	29,0	1,46 (qu, $J= 7,5$ )	2H-19	
19	33,5	2,07 (qu, $J= 6,8$ )	2H-18	2H-17
20	138,9	5,82 (m)	2H-19	2H-18
21	114,7	5,02 (dd, $J= 17,2;$ )		2H-19

Fonte: Dados do autor

### 3.5.1.1.4. Determinação Estrutural de LV-04

O composto LV-04 foi isolado na forma de um sólido amorfo branco, apresentando  $[\alpha]_D^{20} - 60,36^\circ$  (c. 0,1 CHCl<sub>3</sub>) e p.f. 130-132 °C.

A análise do espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de LV-04 (Apêndice D1) apresentou sinais para hidrogênios metílicos em  $\delta_H$  1,58 (dl); 1,00 (s); 0,98 (s); 0,97 (d); 0,96 (d) e 0,68 (s), um sinal para hidrogênio ligado a carbono oxigenado em  $\delta_H$  3,55 (m), além de dois sinais para hidrogênios olefínicos em  $\delta_H$  5,35 (d,  $J= 4,8$ ) e 5,21 (q,  $J= 6,6$ ).

O espectro de RMN <sup>13</sup>C BB (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) de LV-04 (Apêndice D2) apresentou 29 linhas espectrais, sendo quatro sinais para carbonos olefínicos ( $\delta_C$  147,2; 140,9; 121,8; 115,7) e um sinal para carbono oxigenado ( $\delta_C$  71,9). Através da análise dos espectros de RMN <sup>13</sup>C DEPT 135 (Apêndice D3) e RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C HSQC (Apêndice D4) foi possível correlacionar cada hidrogênio ao seu respectivo átomo de carbono, assim como definir o padrão de hidrogenação do composto, como sendo 6 (CH<sub>3</sub>), 10 (CH<sub>2</sub>), 9 (CH) e 4 (C). A presença dos quatro sinais para carbonos olefínicos, cujas atribuições foram confirmadas pelo espectro de HMBC (Apêndice D6) sumarizados na figura 20 (pág. 46), condizente com o Fucosterol (Figura 21, p. 46), um esteroide amplamente encontrado em organismos marinhos, principalmente em algas pardas da família Dictyotaceae (ABDUL *et al.*, 2016).

Figura 20. Correlações observados para LV-04

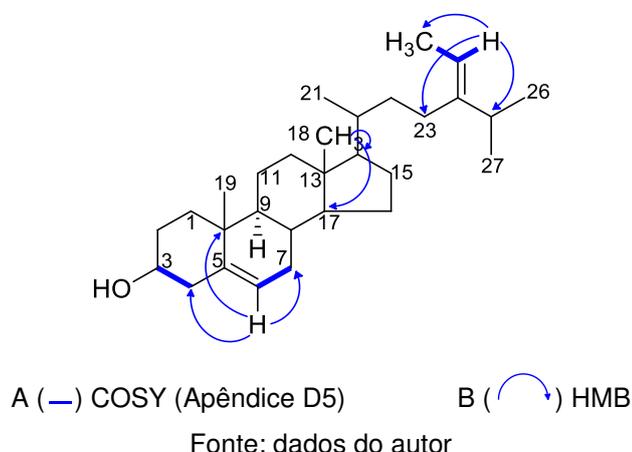
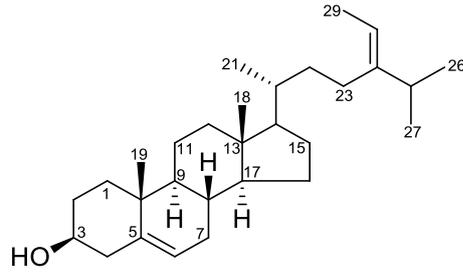


Figura 21. Representação estrutural do Fucosterol



Fonte: dados do autor

O Fucosterol é um dos fitosterol mais abundantes encontrados nas algas marinhas, principalmente em algas pardas e verdes do gênero *Sargassum*. Embora seja uma substância bastante conhecida, o Fucosterol apresenta inúmeras propriedades farmacológicas, com destaque para o seu efeito antidiabético, anti-inflamatório, antioxidante, anticâncer e antiobesidade. (Abdul *et al.*,2016)

Tabela 06. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LV-04 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

C	HSQC		* Literatura ( $\text{CDCl}_3$ , 500)	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$\delta_C$	$\delta_H$
1	37,4	2,03 (m)	37,2	
2	31,2	1,82 (m)	31,6	
3	71,9	3,55 (m)	71,8	3,53 (m)
4	42,5	2,30 (m)	42,2	
5	140,9	-	140,7	-
6	121,8	5,35 (dl, $J= 4,8$ )	121,7	5,33 (dl, $J= 5,0$ )
7	32,1	1,99 (m); 1,43 (m)	31,9	
8	31,8	1,48 (m)	31,9	
9	50,3	0,96 (m)*	50,1	
10	36,7	-	36,5	-
11	21,3	1,50 (m)	21,0	
12	39,9	2,00 (m); 1,11(m)	39,7	
13	42,5	-	42,3	-
14	56,9	1,00 (m)*	56,7	
15	24,5	2,03 (m); 1,85 (m)	24,3	
16	28,4	1,82 (m); 1,25 (m)	28,2	
17	56,0	1,07 (m)	55,7	
18	12,01	0,68 (s)	11,8	0,66 (s)
19	19,5	1,00 (s)	19,4	0,98 (s)
20	36,6	1,99 (m)	36,4	
21	18,9	0,98 (s)	18,7	0,97 (sl)
22	35,4	2,20 (m)	35,2	
23	25,9	1,58 (m)*	25,6	
24	147,2	-	146,9	-
25	34,9	2,26 (m)	34,7	
26	22,4	0,98 (d)	22,2	0,95 (d, $J= 1,5$ )
27	22,3	0,97 (d)	21,1	0,97 (d, $J= 1,2$ )
28	115,7	5,21 (q, $J= 6,6$ )	115,5	5,17 (q, $J= 6,5$ )
29	13,3	1,58 (dl, $J= 6,6$ )	13,1	1,55 (d, $J= 7,0$ )

### 3.5.1.2. Determinação estrutural dos compostos obtidos do extrato acetato de etila de *Lobophora variegata* (EALV)

O extrato AcOEt (18,0 g) de *L. variegata* foi submetido a uma série de fracionamentos cromatográficos incluindo gel de sílica, Sephadex LH-20 e CLAE, culminando no isolamento de cinco compostos, codificados como LV-05 - LV-09 (subitem 3.4.1.2, p. 36).

#### 3.5.1.2.1. Determinação Estrutural de LV-05

Sucessivos fracionamentos cromatográficos da fração C (4,61 g) resultaram no isolamento de uma substância de coloração amarela e aspecto resinoso (subitem 3.4.1.2, p. 36), apresentando  $[\alpha]_D^{20} = -36,03^\circ$  (c. 0,1 MeOH) e UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (pda) de 232 nm (Apêndice B1-c), nomeado como LV-05.

O espectro de massas APCI (Apêndice E7), mostrou um pico referente a molécula protonada ( $[M + H]^+$ ) em  $m/z$  267,1 u.m.a., possibilitando a definição da fórmula molecular  $C_{15}H_{22}O_4$  com IDH=5.

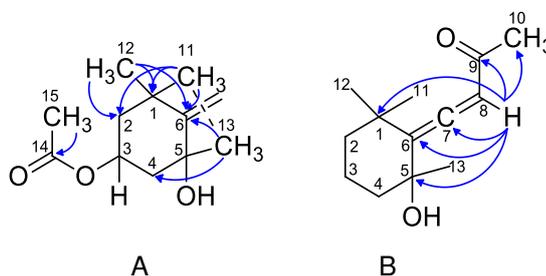
Através da análise do espectro de RMN  $^1H$  (MeOD, 500 MHz) de LV-05 (Apêndice E1) apresentou cinco sinais simpletos, típicos de grupos metílicos em  $\delta_H$  2,20; 2,02; 1,43; 1,39 e 1,16 ppm, bem como sinais para hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_H$  2,25 (ddd,  $J = 12,8; 4,2; 2,1$  Hz, H-4a) / 1,48 (t,  $J = 12,0$  Hz, H-4b) e 2,01 (ddd,  $J = 12,3; 4,2; 2,1$  Hz, H-2a) / 1,58 (dd,  $J = 12,9; 12,9$  Hz, H-2b). Sinais em  $\delta_H$  5,85 (s, H-8) e 5,40 (m, H-3) correspondentes a um hidrogênio olefínico e um oxi metínico, respectivamente.

O espectro de RMN  $^{13}C$  BB (MeOD, 125 MHz) (Apêndice E2) apresentou 15 linhas espectrais, sendo o sinal em  $\delta_C$  211,5 para carbonila de cetona e o sinal em  $\delta_C$  172,4 para grupo acetila. A análise dos espectros de RMN  $^{13}C$  APT (Apêndice E3) e RMN 2D  $^1H, ^{13}C$  HSQC (Apêndice E4) determinou-se o padrão de hidrogenação do composto como sendo 5 carbonos metílicos, 2 metilênicos, 2 metínicos e 6 não-hidrogenados, incluindo dois carbonos carbonílicos. Com o auxílio do espectro HSQC foi possível correlacionar todos os sinais de hidrogênios aos seus respectivos átomos de carbono, destacando os hidrogênios diastereotópicos H-4ab ( $\delta_H$  2,25 e 1,48) /  $\delta_C$

46,2 e H-2ab ( $\delta_H$  2,01 e  $\delta_H$  1,58) /  $\delta_C$  46,1, hidrogênio olefínico H-8 ( $\delta_H$  5,85) com  $\delta_C$  101,4 e o hidrogênio oxi metínico H-3 ( $\delta_H$  5,38) com  $\delta_C$  69,1.

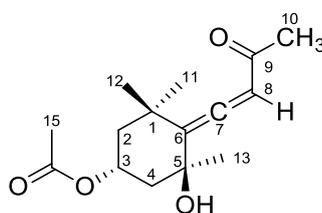
O espectro HMBC de LV-05 (Apêndice E6) mostrou correlações entre os sinais dos hidrogênios metílicos H-11, H-12 e H-13 com os carbonos do anel de seis membros em  $\delta_C$  37,0 (C-1), 46,2 (C-2), 46,1 (C-4) e 119,8 (C-6) como mostrado na figura 22 (p. 00) subestrutura A. Verificou-se ainda correlações entre o hidrogênio olefínico  $\delta_H$  5,85 (H-8) com os sinais em  $\delta_C$  26,8 (C-10); 37,0 (C-1); 72,3 (C-5); 119,7 (C-6); 200,8 (C-9) e 211,5 (C-7). Essas correlações a até 4 ligações, incluindo o sinal de carbono em  $\delta_C$  211,5 é indicativo de sistema conjugado contendo um carbono alênico em sua estrutura, (El Hattab *et al.*, 2008) como observado na figura 22 (p. 49) subestrutura B.

Figura 22. Subestruturas A e B e suas correlações no espectro de HMBC



Fonte: Dados do autor

Figura 23. Estrutura proposta para LV-05

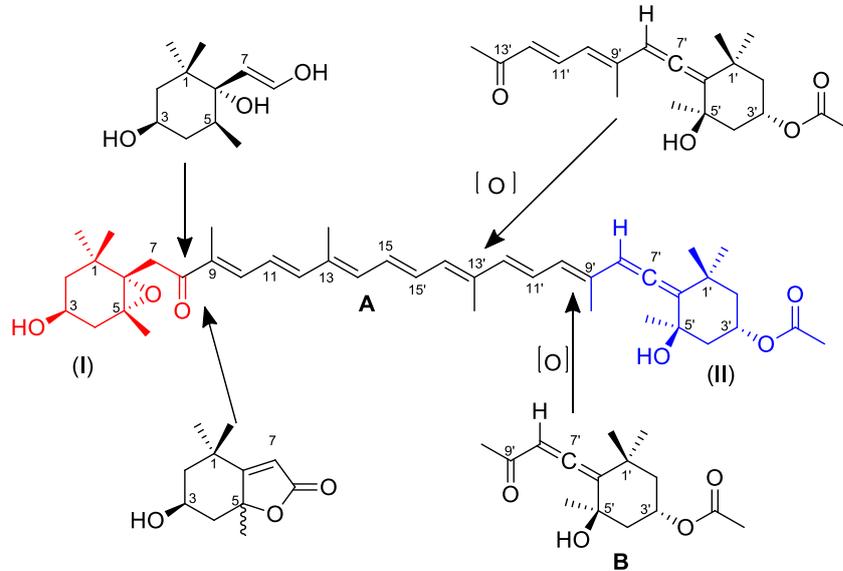


Fonte: Dados do autor

Pesquisas realizadas na literatura acerca do gênero *Lobophora* não apresentaram substâncias compatíveis com os dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  descritos para o composto, sendo que LV-05 (Figura 23, p. 49) apresenta semelhança estrutural com a fucoxantina (Figura 24A, p. 50). A fucoxantina é um pigmento da classe dos carotenoides, conhecido por apresentar inúmeras atividades biológicas e farmacológicas, além de ser o marcador quimiotaxonômico das algas pertencentes a família *Dictyotaceae* (Chuyen; Eun, 2017). Inúmeros estudos mostram que, mesmo em condições naturais, a fucoxantina sofre uma série de processos de degradação e foto-oxidação (Percot *et al.*, 2009; Repeta *et al.*, 1989), resultando em vários

subprodutos, sendo o subproduto (II) compatível com a estrutura proposta para LV-05 (Figura 23, p. 50).

Figura 24. Fucoxantina (A) e seus principais subprodutos de degradação/oxidação



Fonte: Adaptada de (Repeta *et al.* 1989)

Através dos dados obtidos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e comparação com a literatura (Rahelivao *et al.*, 2015), pode-se inferir que LV-05 seja um terpenoide resultante da degradação ou foto-oxidação da fucoxantina, conhecido como *apo-9'*-fucoxantina, já registrado na literatura em diversas espécies de algas pardas e em plantas superiores (RAHELIVAO *et al.*, 2015). A formação do composto passa pela clivagem oxidativa da dupla ligação do carbono 9' da fucoxantina, resultando na formação da metil cetona observada na estrutura. Esse processo pode ocorrer também em outras partes da molécula (Percot *et al.*, 2009; Repeta *et al.*, 1989), como mostrado na figura 24 B (p. 51).

Tabela 07. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LV-05 (MeOD, 500 MHz)

C	HSQC			HMBC			*Lit. (CDCl <sub>3</sub> , 150 MHz)	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)		$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$^{4,5}J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$
1	37,0	-		H-12		H-8	37,1	-
2	46,2	1,58 (dd, $J= 12,9$ , 12,9); 2,01 (ddd, $J= 12; 4; 2$ )			H-12	H-4	46,2	1,56 (dd, $J= 12,8$ ; 11,6); 2,00 (ddd, $J=$ 12,8; 4; 2)
3	69,1	5,38 (m)				H-12	69,3	5,38 (tt, $J= 11; 4$ )
4	46,1	1,48 (br t, $J= 12,0$ ); 2,25 (ddd, $J= 12,8$ ; 4; 2)			H-13	H-2	46,1	1,46 (br t, $J= 12,1$ ); 2,23 (ddd, $J= 12,8$ ; 4; 2)
5	72,3	-		H-4, H-13		H-8	72,3	-
6	119, 8	-			H-4, H-8, H-12, H- 13	H-10	119, 8	-
7	211, 5	-		H-8			211, 5	-
8	101, 4	5,85 (s)			H-10		101, 4	5,86 (s)
9	200, 8	-		H-8			200, 8	-
10	26,8	2,20 (s)			H-8		26,8	2,20 (s)
11	29,4	1,43 (s)				H-8, H-12	29,4	1,43 (s)
12	32,2	1,16 (s)					32,2	1,17 (s)
13	30,7	1,39 (s)					30,7	1,39 (s)
14	172, 4	-		H-15	H-3		172, 4	-
15	21,3	2,02 (s)					21,3	2,03 (s)

Fonte: Dados do autor

\*Rahelivao *et al.*, 2015

## 3.5.1.2.2. Determinação Estrutural de LV-06

Sucessivos fracionamentos cromatográficos da fração C resultaram no isolamento de uma resina de coloração verde, apresentando  $[\alpha]_D^{20} = -45,16^\circ$  (c. 0,1 MeOH) e UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (pda) de 234 nm (Apêndice B1-d), nomeado como LV-06.

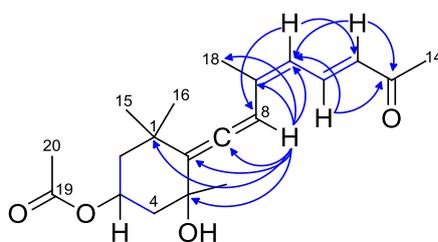
A combinação dos espectros de RMN HSQC e espectro de massas APCI (Apêndice F4), o qual mostrou um pico referente a molécula protonada ( $[M + H]^+$ ) em  $m/z$  333,0 u.m.a., possibilitou a dedução da fórmula molecular  $C_{20}H_{28}O_4$ , a qual apresenta IDH=07.

A análise do espectro de RMN  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 500 MHz) de LV-06 (Apêndice F1) apresentou sinais em  $\delta_H$  2,30; 2,01; 1,90; 1,41; 1,37 e 1,08 para hidrogênios de grupos metílicos, assim como sinais em  $\delta_H$  6,13 (s) e 5,41 (m) para hidrogênios alênico e oxi metínico, respectivamente. Com base no espectro de HSQC (Apêndice F2), o sinal em 5,41 (m) correlacionado com o sinal de carbono em  $\delta_C$  67,9 corresponde a um hidrogênio oxi metínico, enquanto os sinais em  $\delta_H$  7,5 (dd,  $J= 15,2; 15,2$ ), 6,18 (m) e 6,15 (m) correlacionados com os carbonos em  $\delta_C$  138,9 (C-11), 129,6 (C-12) e 126,1 (C-10) correspondem a hidrogênios olefínicos de um sistema  $\alpha, \beta, \delta$  conjugados.

A comparação com os dados de RMN  $^1H$  dos compostos LV-05 e LV-06 nos permitiu propor que LV-06 também seja um produto de foto-oxidação da fucoxantina (Figura 24, p. 51), conhecido como *apo*-13' fucoxantina (Tabela 08, p. 54; Figura 26, p. 54).

A estrutura sugerida para LV-06 foi confirmada através do espectro de HMBC (Apêndice F3), através das correlações observadas do sinal do hidrogênio alênico H-8 ( $\delta_H$  6,13, s) com os carbonos C-1 (36,9); C-5 (73,3), C-6 (118,2); C-7 (205,5); C-9 (142,8), C-10 (126,1) e C-18 (14,7), assim como das correlações dos hidrogênios olefínicos H-10 ( $\delta_H$  6,15, m) com C-8 (102,8) e C-12 (129,6); H-11 ( $\delta_H$  7,50, m) e H-12 ( $\delta_H$  6,18, m) com C-10 (126,1) e C-13 (198,6), conforme ilustrado na figura 25, (p.54).

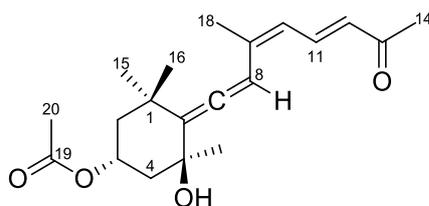
Figura 25. Principais correlações observadas para LV-06



Fonte: Dados do autor

A *apo*-13'-fucoxantina, é formada de maneira análoga a *apo*-9'-fucoxantina, ou seja, através da clivagem oxidativa da dupla ligação do carbono 13', resultando em uma metil-cetona. (Rahelivao *et al.*, 2015)

Figura 26. Representação estrutural de LV-06



Fonte: Dados do autor

Tabela 08. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LV-06 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)

C	HSQC			HMBC			Lit.
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$^{4,5}J_{CH}$	$\delta_C$	
1	36,9	-	Me-16		H-8	36,2	
2	45,4	2,28 (m); 1,40 (m)		H-4, Me-16, Me-17		45,7	
3	67,9	5.41 (m)	H-2, H-4			68,2	
4	45,5	1,97 (m); 1,50 (m)				45,7	
5	73,3	-	Me-17		H-8	72,9	
6	118,2	-		H-8, Me-15-17		118,4	
7	205,5	-	H-8			204,0	
8	102,8	6.13 (s)	H-10		Me-18	103,2	
9	142,8	-		H-11, Me-18		142,8	
10	126,1	6,15 (m)	H-11	H-8, H-12, Me-18		126,1	
11	138,9	7,5 (dd, $J= 15,2; 15,2$ )				139,4	
12	129,6	6,18 (m)		H-10		129,8	
13	198,6	-	H-12; Me-14	H-11		198,9	
14	28,0	2,30				28,2	
15	29,6	1,41				29,5	
16	31,9	1,08				32,4	
17	31,7	1,37				31,5	

<b>18</b>	14,7	1,90 (s)			H-8	14,8
<b>19</b>	170,7	-	Me-20		H-3	170,9
<b>20</b>	21,5	2,01 (s)				21,0

Fonte: Dados do autor

\* El Hattab *et al.*, 2008

### 3.5.1.2.3. Determinação Estrutural de LV-07

Sucessivos fracionamentos cromatográficos da fração C (p. 36) resultaram no isolamento de um óleo amarelo apresentando  $[\alpha]_D^{20} = -27,41^\circ$  (c. 0,1 CHCl<sub>3</sub>) e UV (MeOH)  $\lambda_{\max}$  (pda) de 204 nm (Apêndice B1-e), nomeado como LV-07.

Através do espectro de massas APCI (Apêndice G6), foi observado um pico correspondente a molécula protonada  $[M + H]^+$  em  $m/z$  317,0 u.m.a compatível com a fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub> e (IDH=06). Observou-se ainda fragmentos em  $m/z$  299,0 e  $m/z$  281,1 u.m.a., condizente com a perda de duas unidades de água (-2H<sub>2</sub>O).

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz) de LV-07 (Apêndice G1) apresentou sinais de hidrogênios olefínicos em  $\delta_H$  5,34; 5,38; 5,56 e 5,59, bem como sinais correspondentes a dois grupos vinílicos terminais em  $\delta_H$  5,37 / 5,41 e 4,98 / 5,28. Adicionalmente, exibiram sinais para hidrogênios metilênicos e metínicos.

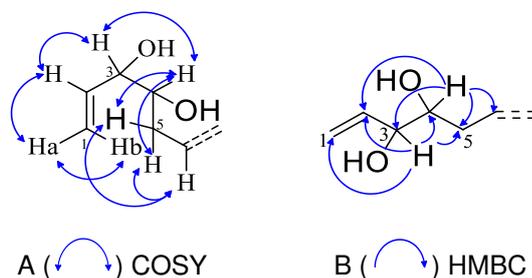
O espectro de RMN <sup>13</sup>C BB (CDCl<sub>3</sub>, 75 MHz) (Apêndice G2) exibiu 20 linhas espectrais, sendo o sinal em  $\delta_C$  25,9 para dois carbonos, em acordo com o espectro de HSQC. Pode-se observar ainda a presença de dois sinais em  $\delta_C$  75,6 e 74,0 para carbonos oxigenados. Já o espectro de RMN <sup>13</sup>C APT (Apêndice F3) mostrou dois sinais para carbonos vinílicos (sinais em  $\delta_C$  117,6 e 114,7) semelhante ao que já foi mostrado para os compostos LV-02 e LV-03.

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de LV-07 se mostraram bastante semelhante com LV-02 e LV-03, exceto pelos deslocamentos químicos em  $\delta_C$  75,6; 74,0 ppm. Esse incremento nos valores de deslocamentos químicos, quando comparados com os do grupo oxirano, pode ser facilmente atribuído a uma reação espontânea de hidrólise do grupo epóxido, resultando em dois grupos hidroxilas (VIEIRA *et al.*, 2016).

Através da análise do espectro de HMBC (Apêndice G4) verificou-se as correlações dos sinais dos hidrogênios oximetínicos em  $\delta_H$  4,03 ( $J = 5,8$  Hz, H-3) e

3,59 (m, H-4) com os carbonos em  $\delta_C$  137,7 (C-2); 75,6 (C-3); 74,0 (C-4) e 31,2 (C-5), como pode ser constatado na figura 27 (p. 56).

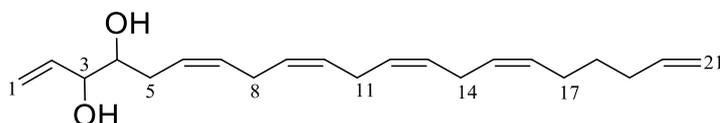
Figura 27. Principais correlações (A) e acoplamentos (B) observados para LV-07



Fonte: Dados do autor

Os dados obtidos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  em comparação com a literatura corroboram com a proposta estrutural de LV-07 (Tabela 09, p. 56), como sendo um produto de hidrólise de LV-02, previamente descrito como lobophorenol B, mostrado na figura 28 (p. 56).

Figura 28. Representação estrutural de LV-07



Fonte: Dados do autor

O lobophorenol B pode ser tanto um derivado natural do epóxi-lobophorenol A, como um artefato do processo de isolamento, uma vez que o grupo epóxido é bastante reativo, podendo facilmente ser hidrolisado. Vieira *et al.* (2017) foi o primeiro a relatar o isolamento desse composto a partir do extrato diclorometano da alga parda *L. rosácea*, juntamente com outros dois compostos análogos. Neste trabalho foi relatado que em estudos bio guiados *in situ*, os extratos hexânico e diclorometano de oito espécies de algas do gênero *Lobophora*, incluindo *L. rosácea* e seus compostos isolados apresentaram efeito aleloquímico, que poderiam inibir significativamente a fotossíntese de várias espécies de corais associados às espécies de *Lobophora*, causando o embranquecimento e diminuição do metabolismo dessas espécies. Contudo, vale ressaltar que no ambiente natural, não há estudos suficientes que possam justificar os possíveis efeitos negativos relacionados a estas algas. No entanto, elas podem desempenhar papel importante no combate a herbívoros de corais, como ouriços-do-mar, aos quais estão associados. (Vieira *et al.*, 2017)

Tabela 09. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LV-07 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

C	HSQC		HMBC		Literatura (MeOD, 500 MHz)*	
	$\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$ (J em Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$
1	117,6	5,41 (m), 5,37 (m)		H-3	118,4	5,31 (dt, $J=17,0$ ; 1,0) 5,18 (dt, $J=10,0$ ; 1,0)
2	137,7	5,9 (m)	H-3	H-4	139,4	5,92 (m)
3	75,6	4,03 (t, $J=5,8$ )	H-2, H-4	H-1	76,6	3,94 (m)
4	74,0	3,59 (m)	H-3, H-5		75,5	3,48 (m)
5	31,2	2,35 (m)	H-4, H-6	H-3	31,8	2,36 (m), 2,14 (m)
6	125,3	5,56 (m)	2H-5	H-4	127,3	5,51 (m)
7	131,5	5,59 (m)	H-8	H-5	130,8	5,45 (m)
8	25,9	2,83 (m)	H-7	H-6	26,7	2,85 (m)
9	128,8	5,38 (m)			128,7	5,37 (m)
10	128,7	5,38 (m)			129,4	5,37 (m)
11	26,0	2,83 (m)			26,6	2,86 (m)
12	128,1	5,38 (m)			129,0	5,37 (m)
13	128,1	5,38 (m)			129,1	5,37 (m)
14	25,9	2,83 (m)			26,6	2,82 (m)
15	128,0	5,38 (m)			129,3	5,37 (m)
16	130,2	5,34 (m)		18	130,8	5,38 (m)
17	26,9	2,09 (m)	H-18		27,6	2,07 (m)
18	29,0	1,48 (quint, $J=7,6$ )	H-17, H-19		30,1	1,46 (qu, $J=7,0$ )
19	33,5	2,09 (m)	H18, H20	H21	34,4	2,06 (br q, $J=7,0$ )
20	138,9	5,80 (m)	2H-19	H18	139,8	5,82 (ddt, $J=17,0$ ; 10,0; 7,0)
21	114,7	5,28 (m), 4,98 (m)		H19	115,1	5,00 (dq, $J=17,0$ ; 2,0) 4,94 (dt, $J=10,0$ ; 1,0)

Fonte: Dados do autor

\* Vieira *et al.*, 2016

## 3.5.1.2.4. Determinação Estrutural de LV-08

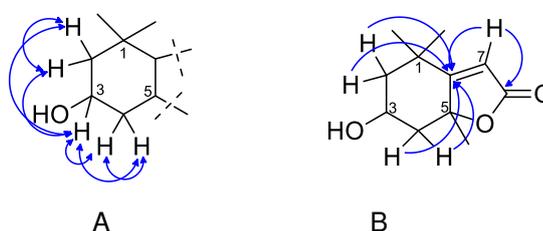
LV-08 foi isolado como uma resina branca, apresentando  $[\alpha]_D^{20} = +47,13^\circ$  (c. 0,1  $\text{CHCl}_3$ ) e UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (pda) de 203 nm (Apêndice B1-f).

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (MeOD, 300 MHz) (Apêndice H1) apresentou sinais condizentes com subprodutos da fucoxantina, como já mencionada anteriormente, destacando-se os sinais para os hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_H$  2,45; 1,76 (H-4ab) e 2,02; 1,51 (H-2ab), juntamente com o sinal do hidrogênio oximetínico em  $\delta_H$  4,32 (m). A ausência de sinal para hidrogênio alênico sugere que o composto em questão seja um subproduto da porção biciclo-furanoide (I) (Figura 23, p. 51).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  BB (MeOD, 75 MHz, Apêndice H2) apresentou 11 linhas espectrais, sendo os sinais em  $\delta_C$  182,0; 175,0 e 111,9 correspondentes a uma lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada. Os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 (Apêndice H3), RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (Apêndice H4) foram utilizados para determinar o padrão de hidrogenação da molécula, como tendo 3 carbonos metílicos, 2 metilênicos, 2 metínicos e 4 não-hidrogenados.

No espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY (Apêndice H5) verificou-se os acoplamentos geminais entre os hidrogênios diastereotópicos em  $\delta_H$  2,45 e 1,76 H- (H-4a e H-4b);  $\delta_H$  2,02 e 1,51 (H-2a e H-2b) com o hidrogênio em  $\delta_H$  4,32 (H-3). Já no espectro de HMBC (Apêndice H6) as correlações entre o próton olefínico em  $\delta_H$  5,75 (s) com os sinais em  $\delta_C$  182,0 (C-8) e 175,0 (C-6), sugerem uma estrutura composta por um ciclohexano ligado a uma lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, como proposto na figura 29A (p. 58).

Figura 29. Espectros COSY (A) e HMBC (B)

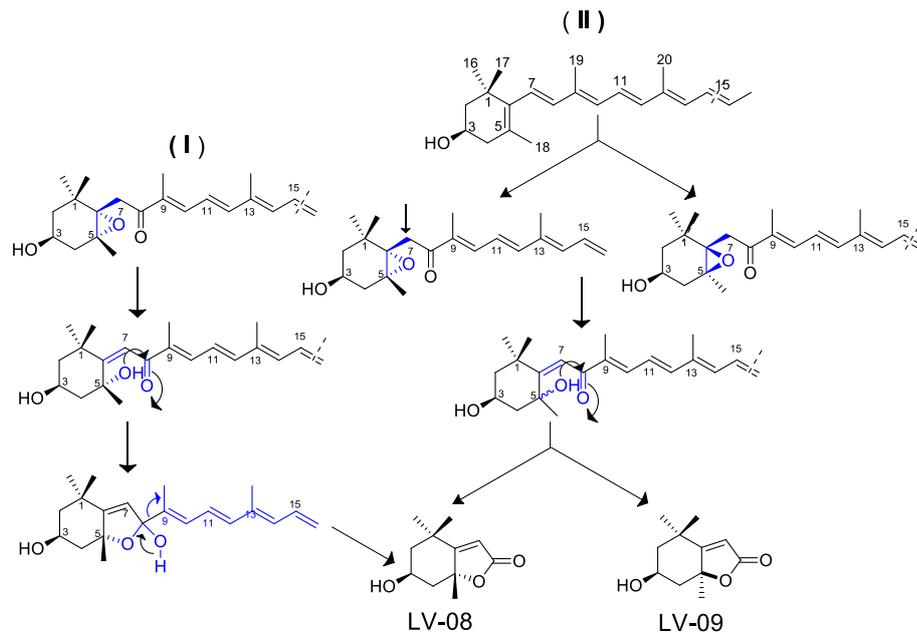


Fonte: Dados do autor

A comparação entre os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LV-08 com a literatura (Tabela 10, p. 60) (Kimura; Maki, 2002) confirmaram a proposta estrutural para o composto, como sendo um subproduto da fucoxantina conhecido como loliolídeo (Figura 30a, p. 59). Repeta *et al.* (1989) mostrou que a formação desse tipo de composto pode ocorrer a partir do  $\beta$ -caroteno e de outros carotenoides. Em ambos os casos, três etapas são significativas. Para os carotenoides que possuem a subestrutura biciclo furanoide (I), como a fucoxantina, a primeira etapa é a oxidação

da molécula através de fermentação biológica catalisada por microrganismos, resultando na abertura do epóxido, seguido por formação de um hemiacetal e posterior lactonização (I). Para os carotenoides que não apresentam a subestrutura biciclo furanoide, como o  $\beta$ -caroteno (II), a etapa inicial é a epoxidação não-estereoespecífica do carotenoide, seguido de rearranjo e fragmentação (II). Esse tipo de formação resulta em uma mistura racêmica das formas 3*S*,5*S* e 3*S*,5*R* conhecidas como loliolídeo (LV-08) e isolololídeo (LV-09) como esquematizados na figura 30 (p. 59) (Adaptado de Repeta *et al.*, 1889).

Figura 30. Etapas de formação de LV-08 a partir da degradação de carotenoides



Fonte: Dados do autor

Pesquisas realizadas mostraram que o loliolídeo pode estar presente em quase todos os tipos de organismos vivos produtores de carotenoides, sendo o principal produto das etapas de degradação química, fotoquímica ou microbiológica dos carotenoides. No gênero *Lobophora*, até a presente data, este é o primeiro relato do isolamento desse composto, embora seja bastante comum em outros gêneros de algas pardas.

Tabela 10. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LV-08 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz)

C	HSQC		HMBC		Literatura ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)*	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$
1	36,1	-			36,3	-
2	47,7	2,02 (dd, $J=14,6$ ; 2,4) 1,51 dd, $J=14,5$ ; 3,6)			47,7	1,96 (dd, $J= 14,6$ ; 2,8) 1,51 (dd, $J= 14,6$ ; 3,6)
3	65,8	4,32 (m)			67,2	4,30 (m)
4	46,7	2,45 (dt, $J= 13,8$ ; 2,4) 1,76 (dd, $J= 15,0$ ; 3,8)			46,0	2,44 (dt, $J= 13,9$ ; 2,7) 1,76 (dd, $J= 13,9$ ; 4,1)
5	86,0	-			87,1	-
6	182,0	-			182,8	-
7	111,9	5,75 (s)			113,3	5,67 (s)
8	175,0	-			172,3	-
9	26,0	1,47 (s)			26,9	1,45 (s)
10	29,5	1,28 (s)			31,1	1,25 (s)
11	25,9	1,78 (s)			27,4	1,76 (s)

Fonte: Dados do autor

\* Kimura; Maki, 2002

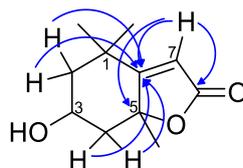
## 3.5.1.2.5. Determinação Estrutural de LV-09

LV-09 foi isolado como uma resina branca, apresentando  $[\alpha]_D^{20} = + 39,72^\circ$  (c. 0,1  $\text{CHCl}_3$ ) e UV (MeOH)  $\lambda_{\text{max}}$  (pda) de 203 nm (Apêndice B1-g).

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (MeOD, 300 MHz) (Apêndice I1), RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT (Apêndice I2) e  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC (Apêndice I3) apresentaram deslocamentos químicos similares a LV-08 (loliolídeo). A comparação dos deslocamentos químicos de LV-09 com os LV-08 (Figura 30, p. 58) e com a literatura (Kimura; Maki, 2002) foram consistentes com o epímero do loliolídeo no carbono C-5, conhecido como isololiolídeo.

As correlações no espectro de HMBC (Apêndice I4) confirmaram a estrutura proposta, onde se verificou a correlação entre o hidrogênio olefínico H-7 (5,77) com os carbonos C-5 (83,5), C-6 (183,9) e C-8 (173,9). As demais correlações podem ser verificadas na figura abaixo.

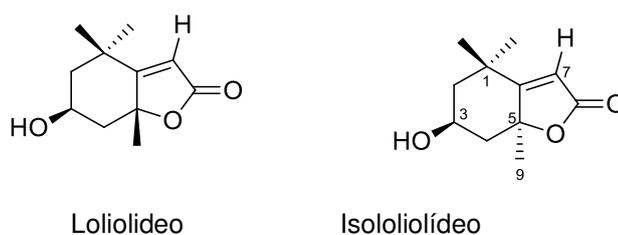
Figura 31. Principais correlações observadas para LV-09



Fonte: Dados do autor

A presença do isololiolídeo é comum, tanto em plantas superiores como em algas marinhas. A formação deste composto já foi abordada na figura 30 (p. 59), esquema (II).

Figura 32. Representação estrutural de LV-08 (loliolideo) e LV-09 (isololiolídeo)



Fonte: Dados do autor

Tabela 11. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de LV-09 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz)

C	HSQC		HMBC		Literatura ( $\text{MeOD}$ , 300 MHz)*	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$^2J_C$	$^3J_C$	$\delta_C$	$\delta_H$
1	36,1	-			36,3	-
2	49,5	2,02 (ddd, $J=12,9; 4,05; 2,1$ ); 1,38 (m)			47,7	2,03 (ddd, $J= 12,9; 4,4; 2,2$ ); 1,51 (dd, $J= 11,7; 4,5$ )
3	65,2	4,13 (m)			67,2	4,13 (tt, $J= 12,1; 12,1$ )
4	48,7	2,50 (ddd, $J= 11,5; 4; 2$ ); 1,45 (t, $J=11,5$ )			46,0	2,53 (ddd, $J= 11,7; 4; 2$ ); 1,76 (dd, $J= 13,9; 4,1$ )
5	88,5	-		H7	87,1	-
6	183,9	-	H7		182	-
7	113,7	5,77 (s)			113	5,71 (s)
8	173,9	-	H7		172	-
9	25,7	1,33 (s)			26,9	1,31 (s)
10	30,3	1,28 (s)			31,1	1,26 (s)
11	25,3	1,59 (s)			27,4	1,58 (s)

Fonte: Dados do autor

### 3.5.2 Testes farmacológicos

Para a realização dos ensaios de atividade biológica apresentados neste trabalho, priorizou-se a utilização dos compostos LV-02 e LV-03 por serem novos compostos e apresentarem quantidade de amostra satisfatória para realização dos experimentos.

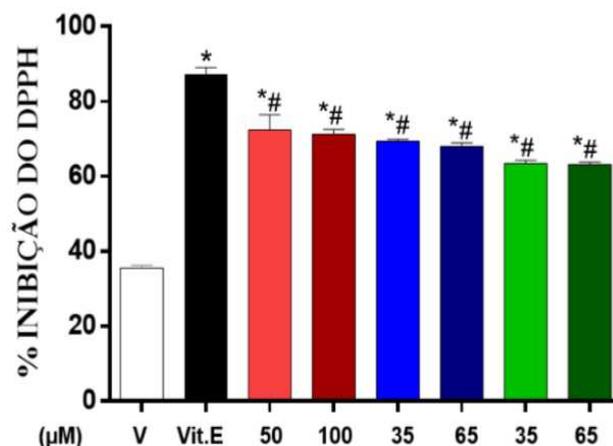
#### 3.5.2.1 Ensaios de atividade antimicrobianos

Os compostos LV-02 e LV-03 foram avaliados contra cepas de bactérias Gram-positiva (*S. aureus* ATCC 6538P) e Gram-negativa (*E. coli* ATCC 10536), contudo não foi possível obter um valor de concentração mínima inibitória (CIM).

#### 3.5.2.2 Ensaios de atividade antioxidante

As concentrações utilizadas dos compostos puros para o teste antioxidante foram de 35, 65 e 100  $\mu\text{M}$ . O DMSO foi utilizado para solubilizar as amostras e, por isso, foi utilizado como controle negativo (V). A vitamina E (Vit. E) por ser um potente agente antioxidante, foi utilizado como controle positivo, juntamente com o DHA ( $\omega$ -3) nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$  (concentrações ativas).

Figura 33. Potencial antioxidante dos compostos pelo teste DPPH



Legenda: V=veículo. Vitamina E (Vit. E) na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  e DHA nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{M}$ , como controle positivo. LV-02 (azul) e LV-03 (verde) nas concentrações de 65 e 36  $\mu\text{M}$ .

Os dados estão apresentados como valor de percentual de inibição do DPPH.

Fonte: adaptado de Ferreira, 2018.

Conforme pode ser apresentado no gráfico, os compostos apresentaram efeito antioxidante similar ao padrão positivo DHA, sendo, portanto, considerados como potentes agentes antioxidantes nas concentrações testadas. (De Gaulejac; Provost; Vivas, 1999)

### 3.5.2.3. Ensaios de atividade citotóxica

Conforme a triagem inicial dos extratos orgânicos de *L. variegata*, o extrato hexânico foi o que apresentou menor valor de  $CI_{50}$  (Tabela 12, p.62) frente a linhagem tumoral HCT116 (câncer de próstata). Com base nestes resultados, os compostos LV-02 a LV-09 foram avaliados, conforme tabela abaixo.

Tabela 12. Concentração inibitória média dos extratos e compostos isolados da alga parda *Lobophora variegata* em células cancerígenas HCT-116.

<b>Amostras</b>	<b><math>CI_{50}</math></b>	<b>(<math>CI_{95\%}</math>) em <math>\mu\text{g/mL}</math></b>
Extrato Hexânico	5,4	4,9 – 5,8
Extrato Ac. Etila	35,9	31,4 – 41,0
Extrato Etanólico	>50	-
<b>LV-02</b>	12,2	7,1 a 21,1
<b>LV-03</b>	44,3	30,0 a 65,0
<b>LV-04</b>	>120	-
<b>LV-05</b>	>180	-
<b>LV-06</b>	50,0	22,3 a 112,0
<b>LV-07</b>	23,4	10,0 a 55,0
<b>LV-08</b>	>250	-
<b>LV-09</b>	>250	-
Doxorrubicina	0,4	0,2 - 0,6

Legenda: A inibição do crescimento da linhagem HCT-116 foi avaliada nas concentrações de 0,009 a 250  $\mu\text{M}$  após 72h de incubação pelo ensaio do MTT. Dox. foi utilizada como controle positivo. Os dados estão apresentados como valores de concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) e respectivos intervalos de confiança de 95% ( $CI_{95\%}$ ) obtidos por regressão não-linear (Mosmann, 1983).

Fonte: Adaptado de Ferreira, 2018.

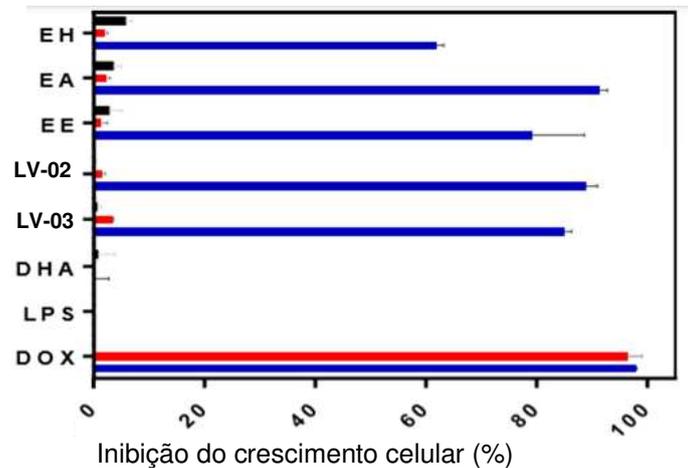
O composto LV-02 foi o que apresentou menor  $CI_{50}$ , porém o valor de 12,2  $\mu\text{M}$  é considerado pouco ativo.

Os compostos LV-02 e LV-03 foram avaliados também pelo método SRB (Papazisis *et al.*, 1997, Vichai; Kirtikara, 2006) contra a proliferação das linhagens de células cancerígenas HCT-116 nas concentrações de 0,01 – 165  $\mu\text{M}$ , onde apresentaram  $\text{CI}_{50}$  de 8,6 e 8,1 respectivamente. Os valores obtidos em ambos os ensaios de inibição do efeito antiproliferativo foram considerados fracos.

#### 3.5.2.4. Ensaios de atividade anti-inflamatório

Para avaliar o efeito imunomodulador em macrófagos é necessário existir integridade celular. Para isso é necessário determinar a concentração mínima na qual os compostos não afetem ou inibam o crescimento celular (proliferação) de macrófago RAW-264.7 incubados por 24 h. A concentração que não possui toxicidade nas células RAW-264.7 e, ainda, produz efeito imunomodulador em macrófagos estimulados ou não com 100 ng/ml LPS pode ser vista na figura 34.

Figura 34. Efeito antiproliferativo dos epóxi-lobophorenos sobre células RAW-264.7



Legenda: EH: extrato hexânico, EA: extrato acetato, EE: extrato etanólico. DHA: ácido docosahexaenóico, LPS: lipopolissacarídeo. A inibição do crescimento da linhagem RAW-264.7 foi avaliada na concentração de 3,5  $\mu\text{M}$  (preto), 35  $\mu\text{M}$  (vermelho) e 165  $\mu\text{M}$  (azul) após 24h de incubação pelo ensaio do SRB. A doxorubicina (DOX) nas concentrações de 2,5  $\mu\text{M}$  (vermelho) e 12,5  $\mu\text{M}$  (azul) e o DHA foram utilizados como drogas padrão puro. Os dados estão apresentados como percentual de inibição do crescimento.

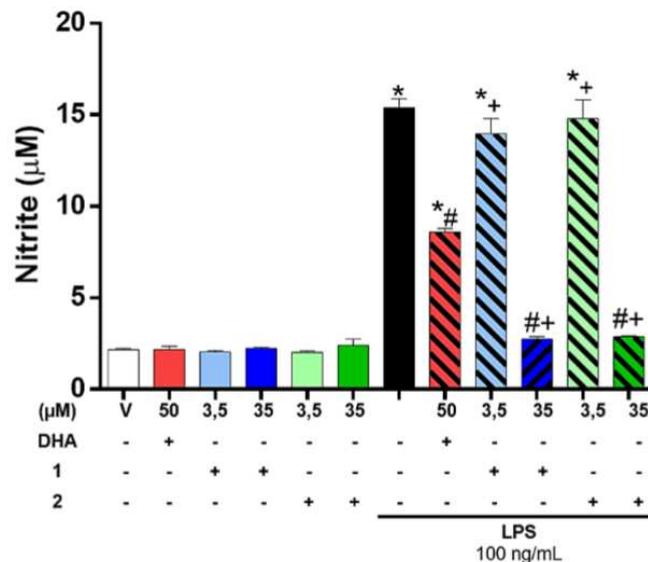
Fonte: Adaptado de Ferreira, 2018.

Como mostrado na figura 33, o LPS e o DHA não apresentaram efeito antiproliferativo em macrófagos nas concentrações testadas. LV-02 e LV-03 apresentaram inibição da proliferação dos macrófagos na concentração 165  $\mu\text{M}$ ,

contudo, na concentração de 35  $\mu\text{M}$  não foi observado tal efeito. Desta forma os compostos nas concentrações 3,5 e 35  $\mu\text{M}$  foram utilizados nos ensaios para avaliação do efeito modulador da resposta de macrófagos tratados com LPS 100 ng/mL.

A fim de encontrar efeito modulador da resposta de macrófagos ao LPS, foi avaliado a inibição da produção do óxido nítrico ON, de forma indireta, através da detecção de nitrito ( $\text{NO}^{2-}$ ), composto estável derivado do ON. Este é um importante mediador inflamatório produzido pela ON sintase induzida (iNOS). Níveis elevados de NO estão presentes em diversas doenças inflamatórias crônicas e agudas, artrite, úlcera gástrica e doenças autoimunes (Guzik *et al.*, 2003). Os compostos LV-02 e LV-03 nas concentrações testadas, inibiram a produção de ON estimulada por LPS em macrófagos RAW-264.7, como pode ser visto na figura abaixo.

Figura 35. Efeito dos compostos LV-02 e LV-03 em células RAW-264.7 estimulados ou não com LPS na produção de Nitrito



Legenda: V= veículo (DMSO 0,4%). As concentrações de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$  dos compostos LV-02 (azul) e LV-03 (verde) não tóxicas em célula RAW-264.7 foram usadas 1 hora antes da ativação dos macrófagos pelo LPS (preto). O DHA (ácido docosahexaenóico) foi usado como droga padrão puro. Após 24h de incubação, o sobrenadante foi recolhido e o nitrito dosado pelo ensaio de Griess.

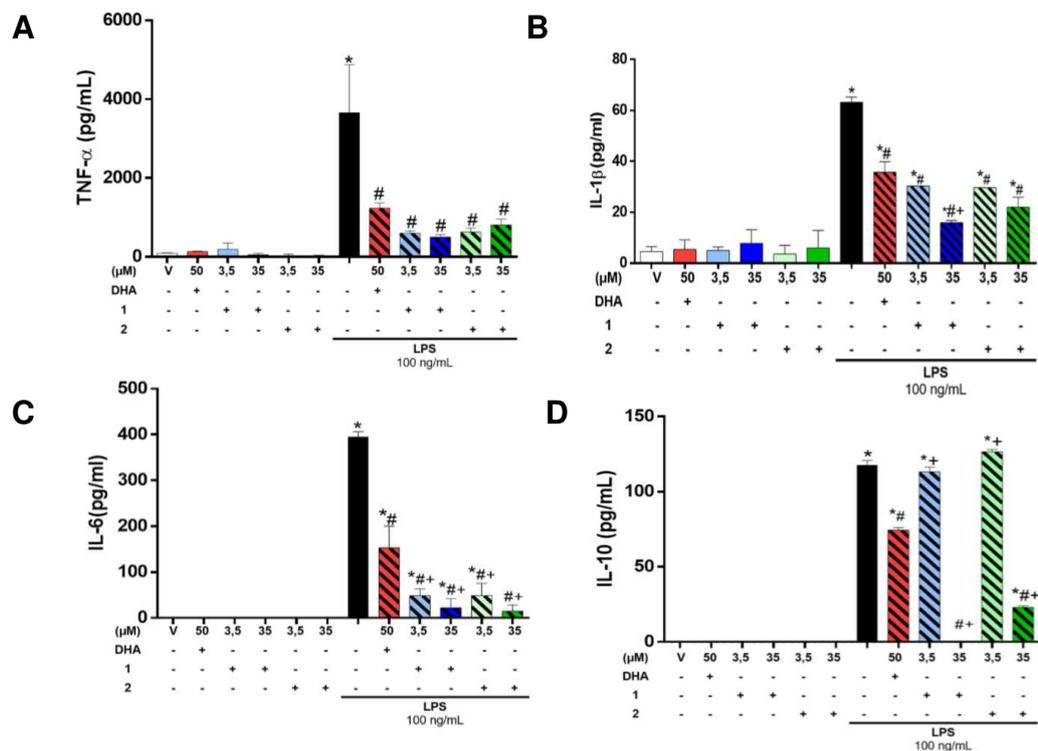
Fonte: Adaptado de Ferreira, 2018

Na Figura 35 (p. 65) tanto o composto LV-02 quanto o LV-03, em concentração menor que o DHA, inibiram a produção de nitrito nas células estimuladas com LPS quando comparados com as células tratadas apenas com LPS. Nas células

não estimuladas com LPS (Green; Tannenbaum; Goldman, 1981), os compostos não produziram nitrito. A baixa presença de Nitrito no sobrenadante das células indica a baixa produção de óxido nítrico (Luster; Alon, Von Andrian, 2005). Substâncias que inibem a produção de óxido nítrico podem também inibir a produção de outros mediadores inflamatórios. (Nourshargh; Alon, 2014)

Mesmo sem podermos afirmar qual o mecanismo de ativação causado pelos compostos LV-02 e LV-03 em macrófagos com esse ensaio, este favoreceu a investigação da produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Essa investigação foi realizada pelo ensaio de ELISA com as concentrações de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$  dos compostos LV-02 e LV-03 e 50  $\mu\text{M}$  da droga padrão puro DHA. O equilíbrio entre as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ) e anti-inflamatórias (IL-10) é fundamental para uma resposta imune eficiente. Nesse ensaio pode-se observar que os compostos apresentaram respostas promissoras em ambas as citocinas testadas, como pode ser verificado na figura 36.

Figura 36. Produção das citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em células RAW-264.7 estimuladas com LPS e tratadas com os compostos LV-02 e LV-03



Legenda: **A** (produção de TNF- $\alpha$ ), **B** (produção de citocina IL-1  $\beta$ ), **C** (Produção de citocina IL-6), **D** (Produção de citocina IL-10). V: DMSO, LPS: lipopolissacárido, DHA (ácido docosa-hexaenóico, 1: LV-02, 2: LV-03.

Fonte: Adaptado de Ferreira, 2018

A produção de citocinas envolvidas na inflamação é um indicativo de ativação dos macrófagos por determinadas substâncias de interesse (Saqib *et al.*, 2018). No ensaio imuno enzimático pode-se observar que os epóxi-lobophorenos reduzem a produção das citocinas pró-inflamatórias (Figura 36A-C, p. 66) além de promover um aumento significativo de citocinas anti-inflamatórias (Figura 36-D, p. 66).

### 3.6 Considerações do capítulo

Neste trabalho foram isolados nove compostos, sendo três policetideos de cadeia longa ( $C_{21}$ ), dos quais dois são inéditos. Obteve-se ainda quatro derivados terpênicos, um esteroide e um carotenoide.

Nos ensaios de atividade biológicas, os novos compostos epóxi-lobophorenos A e B não apresentaram potencial antimicrobiano, porém nos ensaios de atividade antioxidante, estes compostos, nas concentrações de 35 e 65  $\mu\text{M}$ , foram capazes de reduzir significativamente a liberação de radicais livres no meio (DPPH). O potencial antioxidante observado foi semelhante ao do DHA ( $\omega$ -3) e o da vitamina E, utilizados como referência.

No ensaio de atividade citotóxica, os compostos epóxi-lobophorenol A ( $CI_{50}$  12,2) e lobophorenol B ( $CI_{50}$  23,4) foram considerados fracamente ativos nas concentrações testadas, enquanto os demais compostos não apresentaram efeito antiproliferativo nas concentrações testadas e foram classificados como inativos. O epóxi-lobophoreno B ( $CI_{50}$  8,1) apresentou efeito antiproliferativo fraco pelo método do SRB, similar ao epóxi-lobophoreno A ( $CI_{50}$  8,6).

Os compostos epóxi-lobophorenos A e B foram considerados potentes candidatos no combate aos processos inflamatórios, uma vez que não apresentaram efeito antiproliferativo nas concentrações testadas, utilizando a linhagem de macrófago murino RAW-264.7. Os compostos testados inibiram totalmente a liberação de ON (ativação clássica do macrófago), enquanto o DHA ( $\omega$ -3) na concentração padrão inibiu 44%, utilizado como controle positivo.

#### 4. ***DICTYOTA MENSTRUALIS* E *DICTYOTA MERTENSII*: aspectos gerais, estudo químico e investigação farmacológico dos compostos**

##### 4.1 **Aspectos Gerais**

O gênero *Dictyota* (J.V. Lamouroux), pertencente à família Dictyotaceae (Phaeophyceae). Apresentam distribuição cosmopolita, sendo mais frequente em águas quentes das regiões tropicais e subtropicais (Cheng *et al.*, 2014; Guiry; Guiry, 2019). As algas pertencentes ao gênero *Dictyota* são conhecidos por produzirem metabólitos estruturalmente diversificados, incluindo terpenos, fenóis, esteróis, ácidos graxos e polissacarídeos, o que lhes garante uma excelente adaptabilidade aos diversos ecossistemas que habitam. (Chen *et al.*, 2018)

Para o gênero *Dictyota*, *D. dichotoma* e *D. menstrualis* são reconhecidas como espécies de referência para classificação taxonômica para as demais espécies, tendo os diterpenos como os principais metabólitos secundários produzidos. (Ayyad *et al.*, 2011) Embora os diterpenos sejam largamente produzidos por diversos organismos marinhos e terrestres, algumas estruturas (esqueletos) são consideradas características do gênero, tais como os diterpenos de esqueleto dichotomano (Teixeira; Cavalcante; Pereira, 2001). Esses compostos apresentam inúmeras propriedades biológicas e farmacológicas, sendo o potencial citotóxico e antiviral os mais abundantemente mensurados. CHEN *et al.*, 2018) Outras propriedades são: antibacteriana, algicida, anticoagulante, antioxidante, doenças vasculares. (Ioannou *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2014; Bianco *et al.*, 2015)

##### 4.2 **Considerações Botânicas acerca das espécies *D. menstrualis* e *D. mertensii***

O gênero *Dictyota* é formado por cerca de 97 espécies taxonomicamente reconhecidas, sendo outras 110 designações ou sinônimas também verificadas na literatura (Guiry; Guiry, 2019). Incertezas taxonômicas são observadas para o gênero, principalmente, devido às semelhanças morfológicas com as algas pardas pertencentes ao gênero *Canistrocarpus*, antes pertencente ao gênero *Dictyota*, sendo atualmente aceito a descrição taxonômica realizada por Silberfeld *et al.* (2014).

Cientificamente, *D. menstrualis* e *D. mertensii* apresentam a seguinte classificação sistemática simplificada a seguir.

- **Reino:** Cromista
- **Filo:** Ochrophyta
- **Classe:** Phaeophyceae
- **Ordem:** Dictyotales
- **Família:** Dictyotaceae
- **Gênero:** *Dictyota*
- **Espécie:** *menstrualis/mertensii*

Quanto a sua estrutura Morfologia, as algas pardas do gênero *Dictyota* apresentam as seguintes estruturas básicas. (Silberfeld *et al.*, 2014) (Figura 37, p. 70).

- Talos achatados, em formato de fita ou laço, reto ou prostrado, com margens lisas (*D. mertensii*), dentadas, entalhadas ou ciliadas (*D. menstrualis*); preso por rizóides basais ou processos rizoidais as margens dispersas pelas bordas do talo ou restrito a base.
- Rizoides estoloníferos podem estar presentes ou não; ramificação dicotômica, anisotomosa ou alternativa, raramente Falcato; ápices arredondados, apiculados ou agudos.
- Os “pêlos phaeophyceanos” responsáveis pelas proliferações superficiais presentes ou ausentes com talos diferenciados em um córtex e uma medula, o número relativo de camadas variável. O número de estrutura de esporos pode ser isolado, agrupado ou em torno de um tufo central, com um invólucro conspícuo de pilhas estéreis ou por uma única pilha de haste.

Figura 37. *Dictyota menstrualis*, vista frontal



Fonte: Adaptado do arquivo pessoal pertencente ao Dr. Pedro Bastos M. Carneiro

#### 4.3 Revisão Bibliográfica do gênero *Dictyota*

Na família Dictyotaceae, o gênero *Dictyota* é o mais representativo, tanto em número de espécies quanto em número de pesquisas e publicações científicas. Segundo Gaysinski *et al.* (2015), o gênero *Dictyota* foi responsável por mais de 65% de todos os artigos publicados em periódicos até 2015. Nos últimos 20 anos, 604 artigos foram publicados referente ao estudo químico, farmacológico, biológico, taxonômico e áreas afins, relacionados a algas pertencentes ao gênero *Dictyota*, incluindo algumas espécies que hoje estão classificadas em outros gêneros (Fig. 38).

Figura 38. Artigos publicados nos últimos 20 anos sobre o gênero *Dictyota*

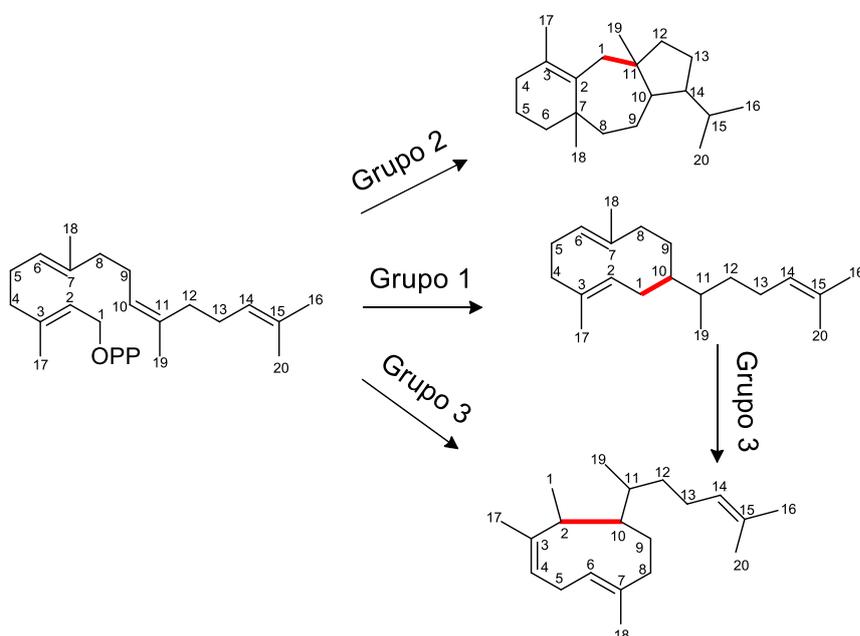


Fonte: <https://scifinder.cas.org>

O gênero *Dictyota* é conhecido por produzir diversas classes de metabólitos, sendo os terpenos, principalmente diterpenos, os mais isolados. Mais de 400 novos diterpenos foram relatados até a presente data, com cerca de 15 esqueletos diferentes (Cheng *et al.*, 2014). Chen *et al.* (2018) realizou um trabalho de revisão bibliográfica acerca do gênero *Dictyota*, no qual englobou todos os diterpenos bioativos publicados até o fim de 2017. Nesse trabalho foi adotado a divisão dos diterpenos obtidos no gênero em três grupos principais (Figura 39, p. 71). Essa divisão biogenética foi proposta inicialmente por Teixeira e Kelecom (1988), no qual organizaram todos os diterpenos obtidos de espécies do gênero *Dictyota* baseada na primeira ciclização formal do precursor geranil-geraniol. (Vallim *et al.*, 2005) Atualmente, esse esquema biogenético foi revisado e formalmente aceito pela comunidade científica. (Chen *et al.*, 2018)

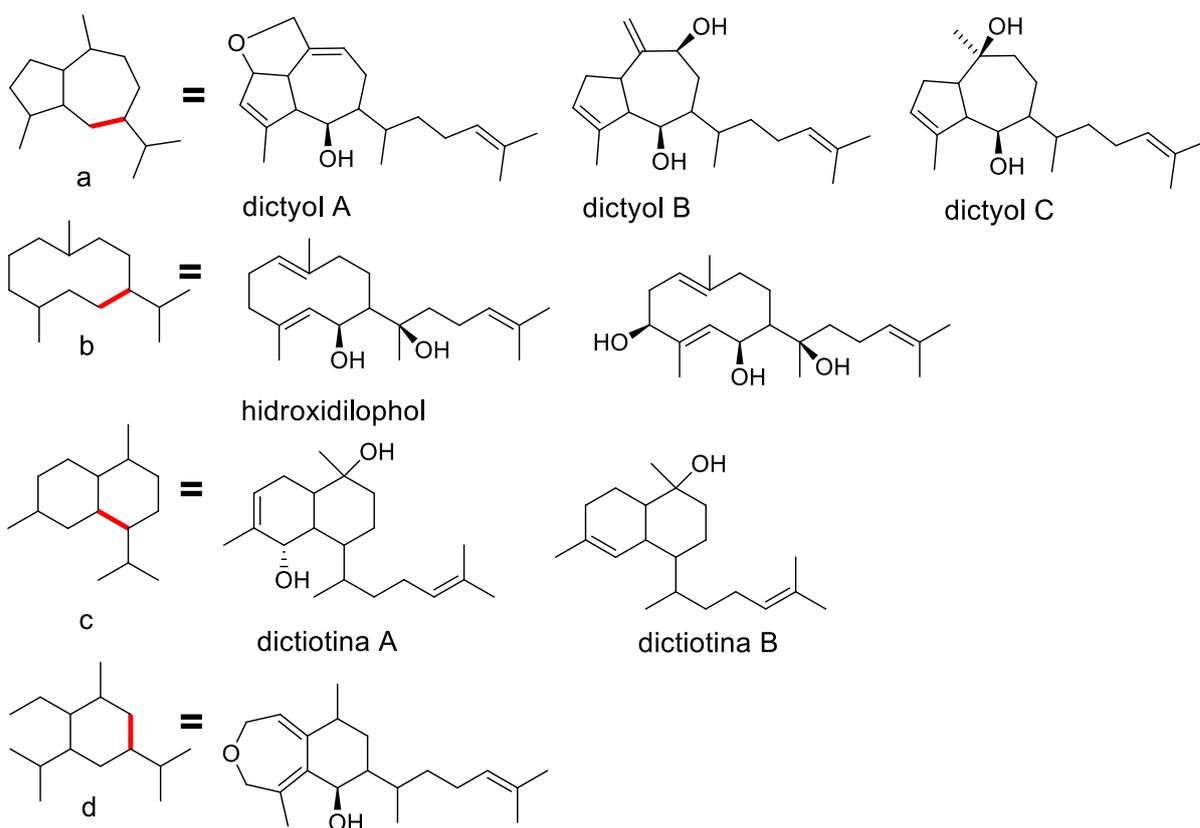
O grupo 1 engloba diterpenos formados pela primeira ciclização entre os carbonos C1 e C10 do precursor geranil-geraniol (Figura 39, p. 71). Nesse grupo encontram-se, principalmente, derivados prenilados baseados no esqueleto de sesquiterpenos guaiano (Figura 40a, p. 72), tendo mais de 50 representantes já reportados. Outros esqueletos sesquiterpênicos são: germacreno, cadinano e *epi*-elemano (Figura 40b-d, p. 72). Os diterpenos de esqueleto guaiano prenilados são geralmente nomeados em alusão ao gênero: dictyol A-J, pachidictyol A-C. (Vallim *et al.*, 2005; Koleniskova *et al.*, 2009; Abou-El-Wafa *et al.*, 2013).

Figura 39. Esquema biogenético para os diterpenos isolados no gênero *Dictyota*



Fonte: Adaptado de Vallim *et al.*, 2005)

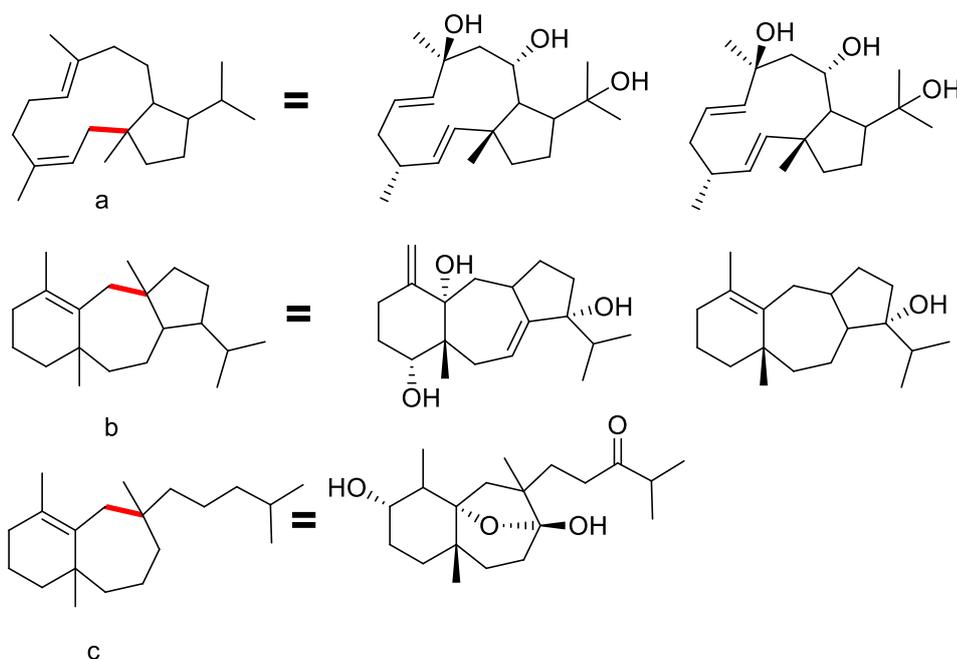
Figura 40. Principais classes de diterpenos do grupo 1



Fonte: Dados do autor

O segundo grupo de diterpenos (grupo **2**) é formado pela primeira ciclização dos carbonos C1 e C11 do precursor geranyl-geraniol (Figura 39, p. 71). Nesse grupo, os diterpenos de esqueleto dolabellano, dolastano e *seco*-dolastano se destacam, com mais de 120 diterpenos relatados (Figura 41, p. 73). Os diterpenos de esqueleto dolabellano são diterpenos bicíclicos formados por anéis de 5 a 11 carbonos. Os dolastanos são diterpenos tricíclicos com anéis de 6, 7 e 5 membros, respectivamente. Já os diterpenos *seco*-dolastanos são formados pela abertura do anel de 5 membros do dolastano. (Chen *et al.*, 2018)

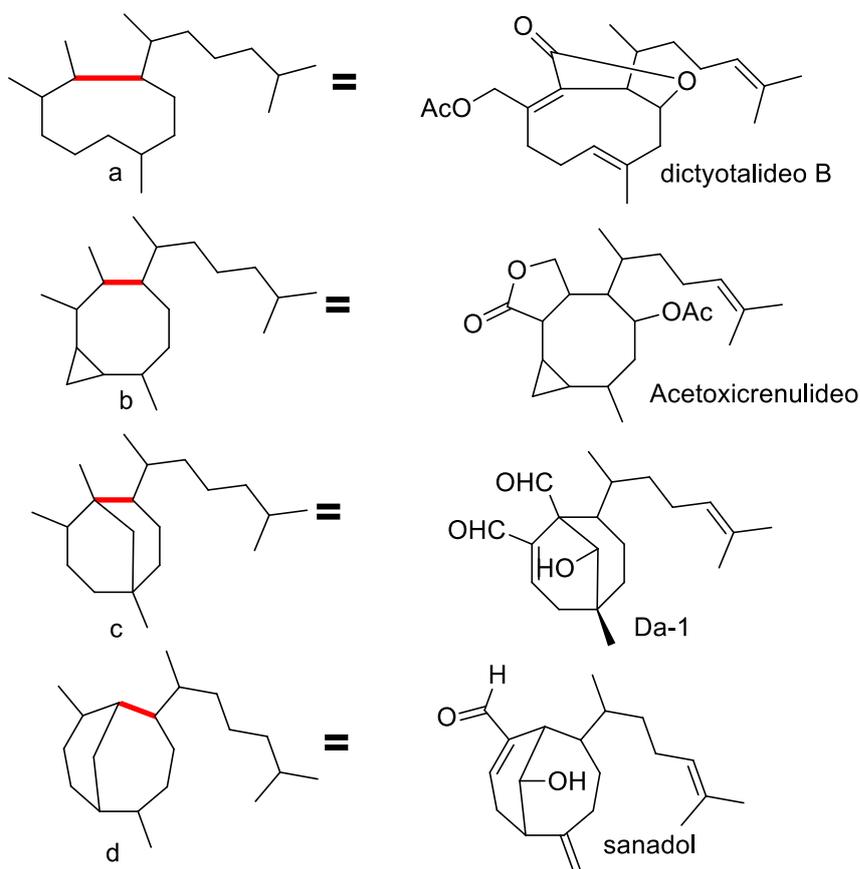
Figura 41. Representação estrutural de diterpenos de esqueleto dolabellano (a), dolastano (b) e *seco*-dolastano (c)



Fonte: Dados do autor

O grupo **3** é composto por diterpenos formados pela primeira ciclização ocorrendo nos carbonos C2 e C10 do precursor geraniil-geraniol ou pela contração do anel do germacreno prenilado (Figura 39, p. 71). Nesse grupo, os diterpenos de esqueleto xenicano são os mais observados. Esses diterpenos tem como estrutura base um anel de nove membros e pode sofrer processos oxidativos, epoxidação, condensação e outros tipos de reações, resultando em diversos tipos de diterpenos monocíclicos, bicíclicos e tricíclicos, tais como os diterpenos de esqueleto crenulidano, crenulano e dichotomano (Figura 42, p. 74).

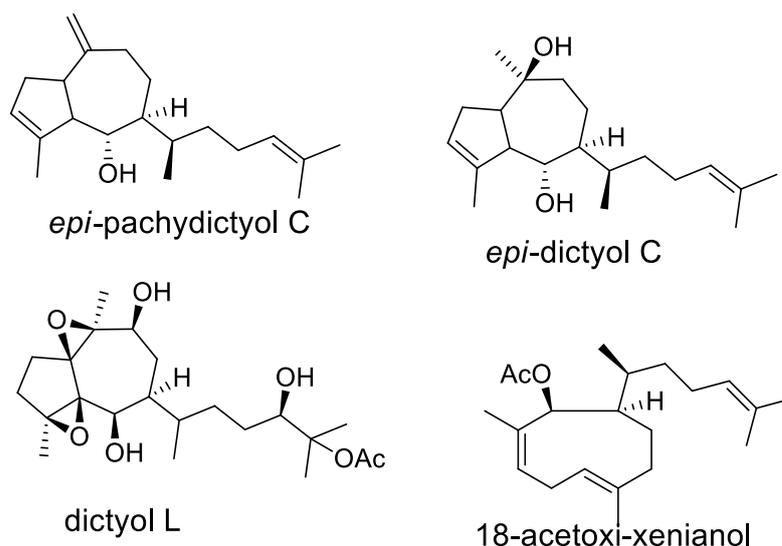
Figura 42. Representação estrutural dos diterpenos de esqueleto xenicano (a), crenulidano (b), dichotomano (c) e crenulano (d) do grupo 3



Fonte: Dados do autor

De janeiro de 2018 até a presente data, 25 publicações já foram disponibilizadas, porém apenas 4 novos diterpenos foram reportados, sendo as demais publicações relacionadas a estudos de atividades biológicas de compostos previamente isolados. Esses compostos foram obtidos por Rubiano-Buitrago *et al.* (2019) a partir do extrato diclorometano/metanol 1:1 da alga parda *D. pinnatifida*. Vale ressaltar que os compostos nomeados de *epi-pachydictyol C* (Figura 43, p. 75) e *epi-dictyol C* (Figura 43, p. 75) são os primeiros relatos de diterpenos de esqueleto guaiano com o grupo hidroxila no carbono C6, em orientação alfa ( $\alpha$ ). Para comprovar a existência desses dois epímeros, os autores se basearam nos acoplamentos observados no espectro de NOE, rotação óptica e modelos computacionais 3D. (Rubiano-Buitrago *et al.*, 2019)

Figura 43. Novos diterpenos isolados de *D. pinnatifida*



Fonte: Dados do autor

#### 4.4 Estudo do material biológico de *D. menstrualis* e *D. mertensii*

##### 4.4.1 Coleta de material biológico, preparação dos extratos e perfil cromatográfico

*D. menstrualis* foi coletada no período de maré-baixa nas praias da Pedra Rachada (03°23'S; 39°54'W), no município de Paracuru e na praia do Pacheco (03°44'S; 38°39' W), no município de Caucaia (Figura 44, p. 78) em março de 2015. Já a espécie *D. mertensii* foi coletada na praia de Flecheiras (3°13' S; 39° 16' 12" W), no município de Trairi, em agosto de 2017. As exsiccatas foram preparadas e identificadas pelo Dr. Pedro Bastos de M. Carneiro e encontra-se depositado no Herbário Profa. Francisca Pinheiro (HMAR), no Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR), sob o número HMAR 2998 e 2999.

Figura 44. Locais de coleta de *D. menstrualis* e *D. mertensii* no litoral cearense



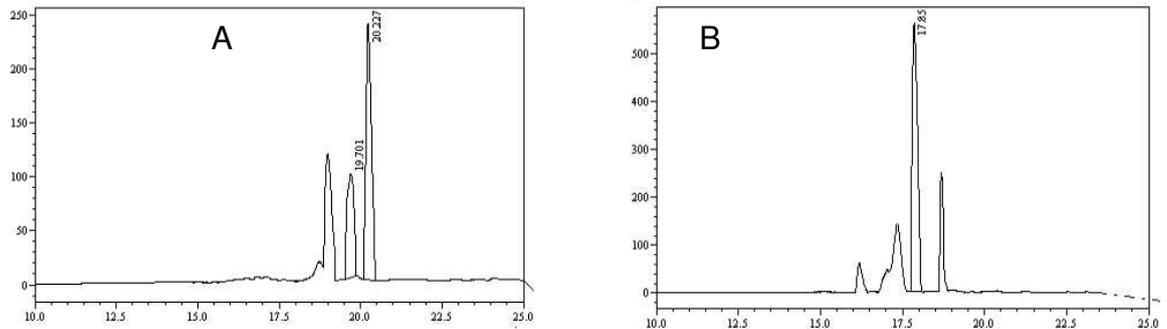
Fonte: Dados do autor

Os materiais biológicos das algas pardas, *D. menstrualis* (aprox. 500 g peso fresco) e *D. mertensii* (aprox. 59,0 g peso seco) foram lavadas abundantemente com água corrente, seguido por lavagem com água destilada e secas à temperatura ambiente por três (03) dias. Após esse período, os materiais secos foram submetidos a extrações com os solventes orgânicos hexano (2X), AcOEt (2X) e EtOH (2X), resultando nos respectivos extratos. Os extratos hexânico e AcOEt de ambas as espécies, separadamente, foram submetidos a diversos fracionamentos cromatográficos, incluindo cromatográfica em coluna em funil poroso, utilizando gel de sílica, sephadex LH-20 e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

#### 4.4.1.1. Fracionamentos cromatográficos do extrato hexânico de *D. menstrualis*

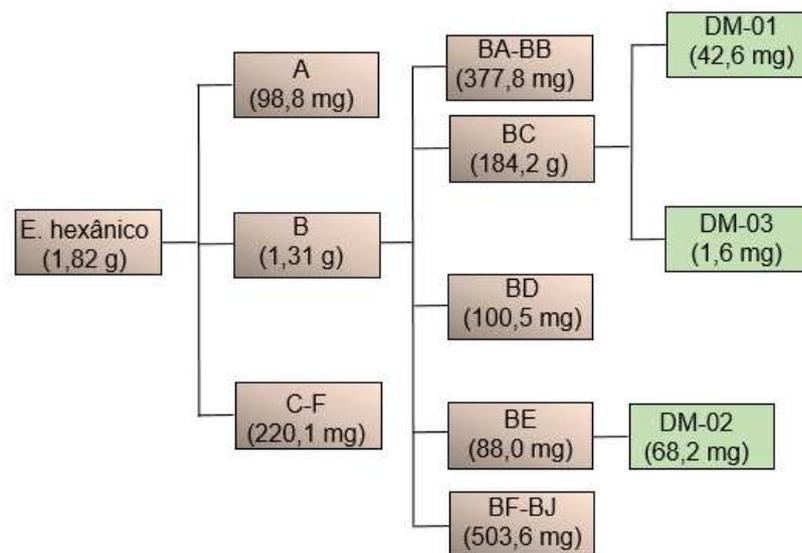
O extrato hexânico de *D. menstrualis* (1,82 g) foi submetido a um fracionamento cromatográfico em funil sinterizado sob média pressão, utilizando gel de sílica como fase estacionária e hexano puro (200 mL), seguido da mistura binária de hexano/acetato de etila em gradiente de polaridade com acréscimo de 20% de acetato de etila para cada fração (100 mL) até acetato puro, resultando em 6 frações (A-F). A fração B (1,31 g) foi fracionada em coluna cromatográfica aberta (CC) sobre gel de sílica e hexano puro (100 mL), seguido da mistura hexano/acetato (200 mL) de etila em gradiente de polaridade com acréscimo de 5% de acetato de etila e hexano/acetato de etila 25%, resultando em 10 subfrações (BA-BJ) reunidas de acordo com as semelhanças apresentadas por análise em CCD. As subfrações BC (184,2 mg) e BE (88,0 mg) foram submetidas a análise e fracionamento por CLAE, utilizando colunas de fase reversa preenchidas com C6-Fenil (250 x 10 mm) da marca Gemini-Phenomenex. O método analítico, método de isolamento e as condições de operação padrão estão descritas no método 3, subitens 5.1.4.1 e 5.1.4.2. (p. 129-130). A partir da subfração BE, foram coletados 3 picos (Figura 45A, p. 80), dos quais DM-01 ( $T_R$  19,70 min) e DM-03 ( $T_R$  20,22 min) foram considerados puros, enquanto da subfração BC foi coletado 4 picos (Figura 45B, p. 80), do qual DM-02 ( $T_R$  17,85 min) foi considerado puro, ambos por análise de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ .

Figura 45. Cromatogramas de isolamento dos compostos DM-01 a DM-03



Fonte: Dados do autor

Fluxograma 03. Metodologia de fracionamento do extrato de etila de *D. menstrualis*



Fonte: Dados do autor

#### 4.4.1.2. Fracionamentos cromatográficos do extrato acetato de etila de *D. menstrualis*

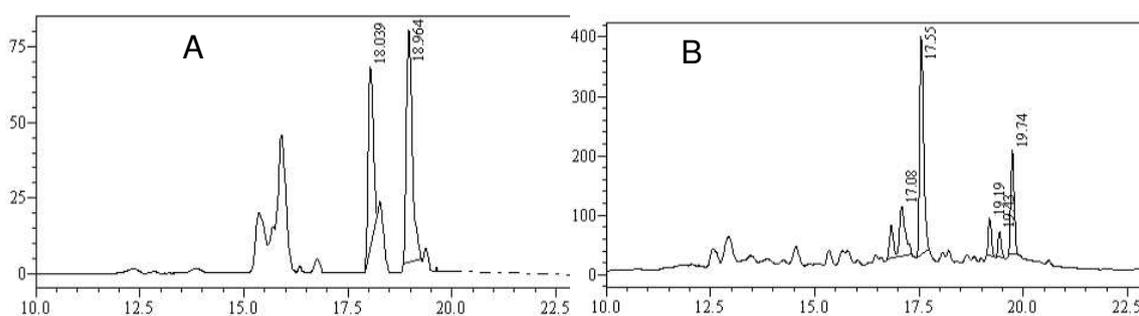
O extrato acetato de etila de *D. menstrualis* (13,7 g) também foi submetido a um fracionamento cromatográfico em funil sinterizado sob média pressão, utilizando gel de sílica como fase estacionária e hexano puro (400 mL), seguido da mistura binária de hexano/acetato de etila com acréscimo de 25% de acetato de etila para cada fração (300 mL), até acetato de etila e metanol puro, resultando em 6 frações (A-F).

A fração B (6,9 g) foi submetido a um fracionamento em coluna cromatográfica aberta sobre gel de sílica, utilizando hexano puro (300 mL), seguido da mistura binária de hexano/acetato de etila (300 mL) nas proporções de 9:1 até 4:6 v/v, seguido de acetato de etila (200 mL) e metanol (100 mL) puro. Após análises por

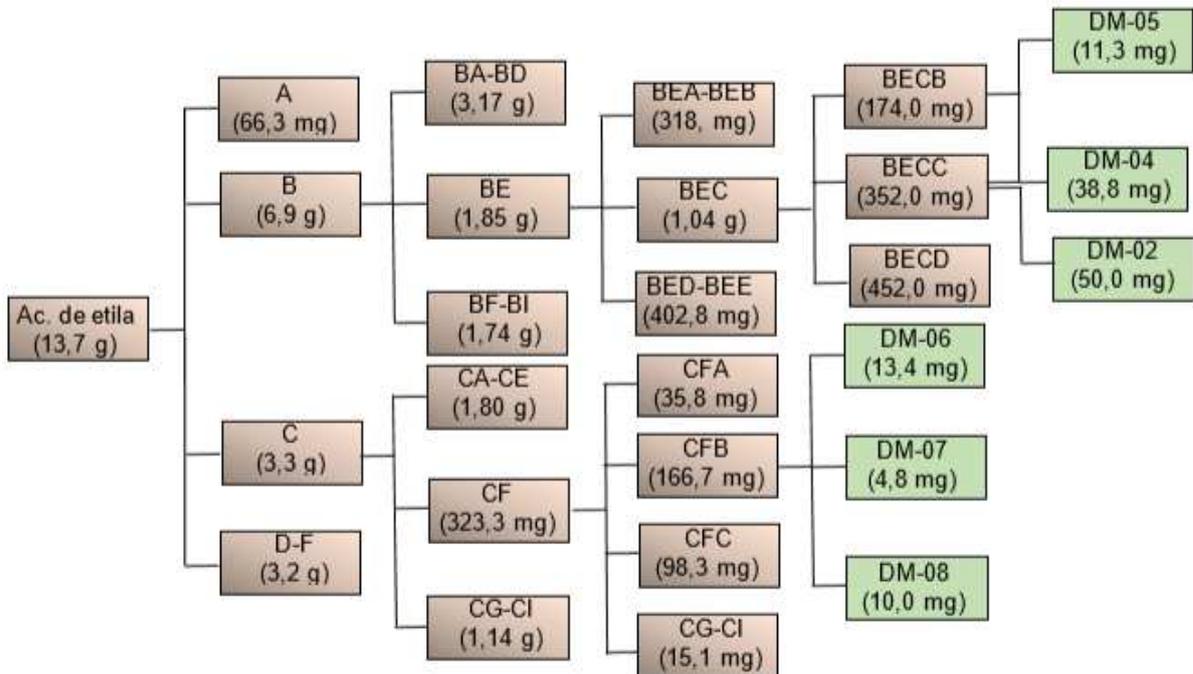
CCD, as frações semelhantes foram reunidas, resultando em nove subfrações (BA-BI). A subfração BE (1,85 g) foi submetida a um novo fracionamento utilizando o mesmo método aplicado à fração B, resultando em cinco subfrações (BEA-BEE) após analisadas por CCD. A subfração BEC (1,04 g) foi diluída na mistura binária de diclorometano/metanol 2:8 e fracionada em coluna preenchida com Sephadex LH-20, resultando nas subfrações BECA (49,0 mg), BECB (174,0 mg), BECC (352,0 mg) e BECD (452,0 mg). As subfrações BECB e BECC foram submetidas a análises por CLAE, utilizando colunas de fase reversa preenchidas com C6-Fenil (250 x 10 mm). O método analítico, método de isolamento e as condições de operação padrão estão descritas no método 4, subitens 5.1.4.1 e 5.1.4.2. (p. 129-130). A partir da subfração BECB foram coletados 3 picos (Figura 46A, p. 81), sendo dois deles considerados puros DM-04 ( $T_R$  18,03 min) e DM-05 ( $T_R$  18,96 min), enquanto da subfração BECC foram re-isolados os compostos DM-02 e DM-04.

A fração C (3,34 g) foi submetido a um fracionamento cromatográfico sob as mesmas condições descritas para a fração B do extrato acetato. Após análises por CCD, as frações semelhantes foram reunidas em dez grupos (CA-CJ). A subfração CF (322,0 mg) foi dissolvida e eluída em metanol, acondicionada sobre Sephadex LH-20, resultando em 46 amostras de 8,0 mL cada. Após análises por CCD, as amostras semelhantes foram reunidas em 4 subfrações (CFA-CFD). CFB (166,7 mg) foi analisada por CLAE nas condições descritas no método 5, subitens 5.1.4.1 e 5.1.4.2. (p. 00), obtendo-se 5 picos (Figura 46B, p.81), dos quais DM-06 ( $T_R$  17,55 min), DM-07 ( $T_R$  19,19 min) e DM-08 ( $T_R$  19,74 min) foram considerados puros após análises por RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ .

Figura 46. Cromatogramas de isolamento dos compostos DM-04 a DM-08



Fonte: Dados do autor

Fluxograma 04. Metodologia de fracionamento do extrato de etila de *D. menstrualis*

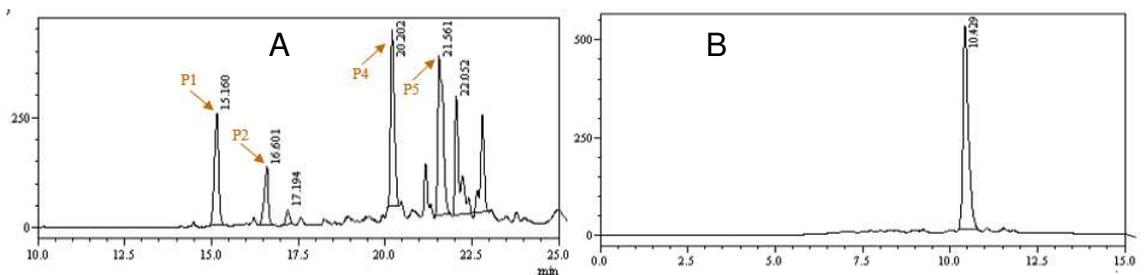
Fonte: Dados do autor

#### 4.4.1.3. Fracionamentos cromatográficos do extrato acetato de etila de *D. mertensii*

O extrato acetato de etila e o extrato etanólico da alga parda *D. Mertensii*, por serem semelhantes, foram reunidos (3,5 g) e submetidos a fracionamento em coluna cromatográfica aberta (CC). Utilizou-se gel de sílica como fase fixa e hexano puro, seguido da mistura binária dos solventes hexano/acetato de etila em gradiente de polaridade, nas proporções de 75:25; 50:50; 25:75; 0:100 de acetato de etila, seguido por metanol puro, como eluentes, resultando em seis frações (A-F). A fração B (2,0 g) foi submetida a um novo fracionamento cromatográfico em CC, utilizando hexano puro, seguido da mistura binária dos solventes hexano/acetato de etila em gradiente de polaridade (9:1; 8:2; 7:3; 6:4; 5:5; 0:100), seguido por metanol puro. Estas frações, após analisadas por CCD, resultaram em 11 subfrações (BA-BK). A subfração BC (343,5 mg) foi dissolvida em metanol e submetida a um fracionamento cromatográfico sobre Sephadex LH-20, resultando em 3 subfrações (BCA-BCC). A subfração BCC (222,0 mg) teve seus compostos purificados por CLAE, utilizando coluna de fase-reversa C6-Fenil, utilizando o método 4 descrito nos subitens 5.1.4.1 e 5.1.4.2. (p. 129-130), resultando em 6 picos (Figura 47A, p. 80), dos quais DM-09

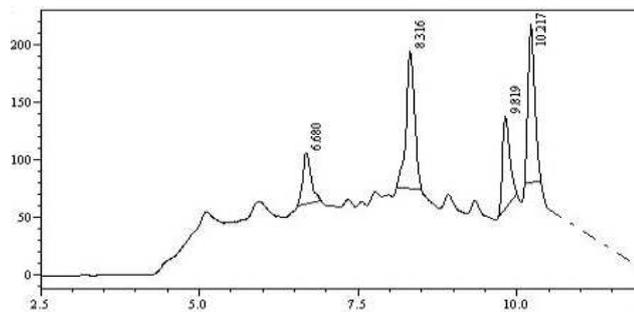
( $T_R$  15,16 min), DM-10 ( $T_R$  16,60 min), DM-11 ( $T_R$  20,20 min) foram considerados puros através da análise por RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ . O pico P5 ( $T_R$  21,56 min) apresentou impurezas na análise por RMN  $^1H$  e foi submetido a nova análise por CLAE, utilizando o método 3, descrito nos subitens 5.1.4.1 e 5.1.4.2. (p. 129-130), resultando na purificação de DM-12 ( $T_R$  10,42 min) mostrado na figura 47B (p. 80). A subfração BF (214,5 mg) foi dissolvida em metanol e submetida a fracionamento cromatográfico sobre Sephadex LH-20, resultando em 3 subfrações (BFA-BFC). A subfração BFB (72,6 mg) foi submetida a CLAE, utilizando o método 3, descrito nos subitens 5.1.4.1 e 5.1.4.2. (p. 130), resultando em 4 picos (Figura 48, p. 80), sendo DM-13 ( $T_R$  10,21 min) apresentando pureza satisfatória após análise por RMN  $^1H$ .

Figura 47. Cromatogramas de isolamento de DM-09 a DM-11 (A) e DM-12

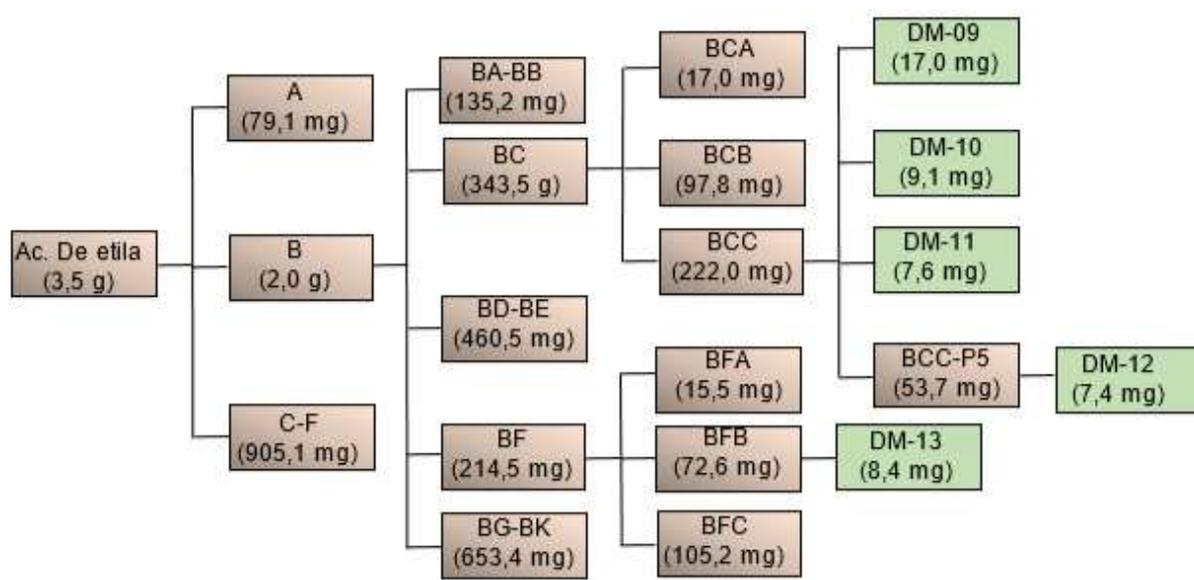


Fonte: Dados do autor

Figura 48. Cromatograma de isolamento de DM-13



Fonte: Dados do autor

Fluxograma 05. Metodologia de fracionamento do extrato de etila de *D. mertensii*

Fonte: Dados do autor

## 4.5. Resultados e discussão

### 4.5.1. Determinação estrutural dos compostos obtidos de *D. menstrualis*

#### 4.5.1.1 Determinação estrutural dos compostos isolados do extrato hexânico de *D. menstrualis*

Sucessivos fracionamentos cromatográficos do extrato hexânico de *D. menstrualis* resultaram no isolamento e caracterização de três (03) compostos, codificados como DM-01, DM-02 e DM-03.

##### 4.5.1.1.1. Determinação estrutural de DM-01

O composto intitulado DM-01 (42,6 mg) foi purificado na forma de uma resina incolor, apresentando rotação específica  $\alpha_D^{21}$ - 4,23 c. 0,07 em MeOH e absorção no espectro ultravioleta DAD-( $UV_{\lambda_{max}}$ ) de 202 nm (Apêndice J1-a) em metanol.

O espectro de massas de alta resolução (Apêndice J11), mostrou um pico referente ao aduto de sódio  $[M + Na]^+$  em  $m/z$  369,2406 u.m.a., indicando a fórmula molecular  $C_{22}H_{34}O_3Na$  (IDH=6). Interessantemente, observou-se picos em  $m/z$

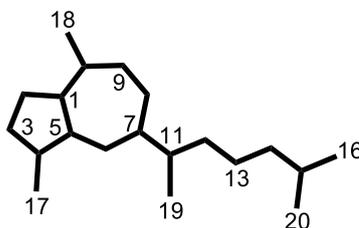
287,2362 e 269,2239, compatíveis com as perdas de uma molécula neutra de ácido acético ( $M+Na-60$ ) e água ( $M+Na-18$ ), respectivamente.

A análise do espectro de RMN  $^1H$  de DM-01 ( $CDCl_3$ , 500 MHz) (Apêndice J2) apresentou um conjunto de sinais entre 5,09 - 3,89 ppm, com destaque para os sinais de hidrogênios vinílicos em  $\delta_H$  5,32 (sl, H-3) e 5,11 (t,  $J= 7,15$  Hz; H-14); hidrogênios metilidênicos em 4,74 (sl, 2H-18) e dois sinais para hidrogênios oximetínicos em  $\delta_H$  3,89 (d,  $J= 13,5$  Hz; H-6) e 4,93 (m, H-12). Os sinais observados entre 2,62 - 1,02 ppm indicaram sinais para hidrogênios metínicos e metilênicos, incluindo sinais para grupos metila ligados a carbonos olefínicos em  $\delta_H$  1,82 (s); 1,69 (s) e 1,62 (s), assim como uma metila duplete em  $\delta_H$  1,02 (d,  $J= 6,8$  Hz) e uma metila de grupo acetila em  $\delta_H$  2,05 (s).

No espectro de RMN  $^{13}C$  BB ( $CDCl_3$ , 125 MHz) (Apêndice J4), observou-se 22 linhas espectrais, sendo os sinais em  $\delta_C$  172,0 (C-12') e 21,3 (C-12'') referentes a um grupo acetila, sugerindo que o composto em discussão se trata de um diterpeno acetilado. Através dos espectros RMN  $^{13}C$  APT (Apêndice J6) e HSQC (Apêndice J7) pode-se classificar os 22 sinais de carbono em 05 carbonos metílicos, 04 metilênicos, 01 metilidênico, 08 metínicos e 04 carbonos não-hidrogenados.

Uma análise detalhada dos dados obtidos nos espectros de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ , quando comparados com a literatura, indicaram que DM-01 possui estrutura condizente com diterpenos de esqueleto guaiano prenilado (Hirschfeld *et al.*, 1973), comumente encontrados em algas do gênero *Dictyota*. (Cheng *et al.*, 2014)

Figura 49. Esqueleto base de diterpenos guaiano prenilado

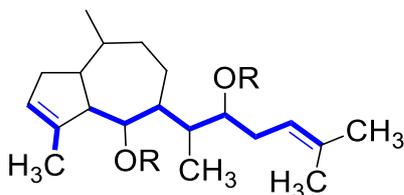


Fonte: Dados do autor

A análise do espectro de RMN 2D  $^1H$ ,  $^1H$  COSY (Apêndice J8) apresentou acoplamentos condizentes para o esqueleto base da molécula (Figura 49, p. 85), com destaque para os acoplamentos entre o sinal do hidrogênio oximetínico em  $\delta_H$  3,89 (d,  $J= 13,5$  Hz; H-6) com os hidrogênios metínicos em  $\delta_H$  2,52 (m, H-5) e 1,59 (m, H-7), bem como do hidrogênio oximetínico em  $\delta_H$  4,93 (m, 3H-12) com H-11 ( $\delta_H$  1,92) e

os hidrogênios alílicos em  $\delta_H$  2,28 (2H-13). Outros acoplamentos podem ser verificados na figura 50 (p. 83).

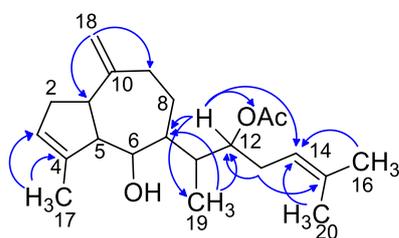
Figura 50. Principais acoplamentos observados para DM-01



Fonte: Dados do autor

No espectro de HMBC (Apêndice J9) foram observadas correlações entre os sinais para os hidrogênios das metilas em  $\delta_H$  1,69 (3H-20) e 1,62 (3H-16) com os carbonos olefínicos em  $\delta_C$  119,9 (C-14) e 134,5 (C-15), bem como da metila vinílica em  $\delta_H$  1,82 (3H-17) com os carbonos  $sp^2$  em  $\delta_C$  123,7 (C-3) e 142,1 (C-4) indicando as ligações duplas em C3/C4 e C14/C15, respectivamente. A posição do grupo acetila em C-12 foi confirmada através das correlações observadas entre o sinal de hidrogênio em  $\delta_H$  4,93 (m, 3H-12) com o carbono carbonílico em  $\delta_C$  172,0 (C-12'), com o carbono olefínico  $\delta_C$  119,9 (C-14) e com o sinal da metila em  $\delta_C$  12,6 (C-19). A posição da dupla ligação exocíclica ( $\delta_H$  4,74/  $\delta_C$  107,4) em C-10, adjacente ao anel de cinco membros, foi confirmado através da correlação do sinal em  $\delta_H$  4,74 com o carbono em  $\delta_C$  46,0 (C-1). As demais correlações observadas para DM-01 encontram-se sumarizadas na figura 51 (p. 83).

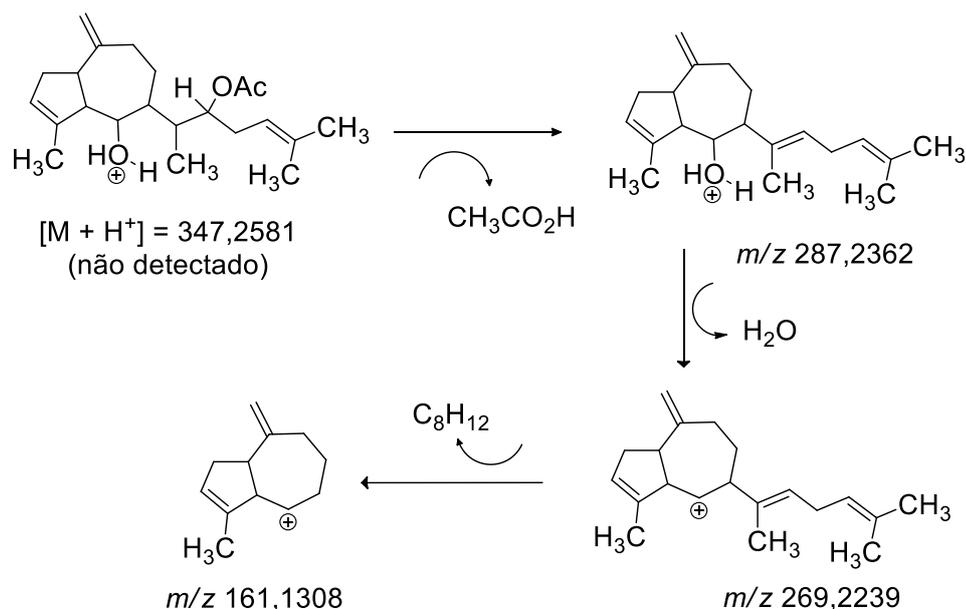
Figura 51. Principais correlações ( $^2J_{CH}$ - $^3J_{CH}$ ) no espectro de HMBC de DM-01



Fonte: Dados do autor

Embora no espectro de massas não tenha sido observado o íon correspondente a molécula protonada, este exibiu três picos em  $m/z$  287,2362 [ $M + H - CH_3COOH$ ] $^+$ ; 269,2239 [ $M + H - CH_3COOH - H_2O$ ] $^+$  e 161,1308 [ $M + H - CH_3COOH - H_2O - C_8H_{12}$ ] $^+$  u.m.a., os quais estão de acordo com a proposta na figura 52 (p. 84).

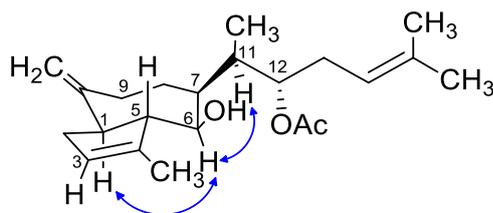
Figura 52. Fragmentos observados no espectro de massas (EMAR-ESI) para DM-01



Fonte: Dados do autor

A estereoquímica relativa de DM-01 foi estabelecida através de comparação com dados descritos na literatura e análise do espectro de RMN 2D,  $^1H$ ,  $^1H$  NOESY (Apêndice J10), no qual verificou-se o acoplamento dipolar para H-6 com H-1 e H-11. A multiplicidade (dt), com valores de constantes de acoplamento ( $J$ ) de 14,7 e 6,2 Hz, para o hidrogênio oxi metínico H-12, sugere fortemente uma conformação *anti* para a metila C-19 e para 12-OAc. A literatura mostra que, em todos os casos em que a estereoquímica do C-11 foi estabelecida, a metila C-19 está sempre na posição  $\beta$ , portanto o grupo acetoxila no carbono C-12 deve estar na posição  $\alpha$  (Cheng et al., 2014). Vale ressaltar que a fusão dos anéis do sistema peridro azuleno é sempre *trans*. (Hirschfeld et al., 1973; Cheng et al., 2014)

Figura 53. Acoplamentos dipolares observados no espectro de NOESY

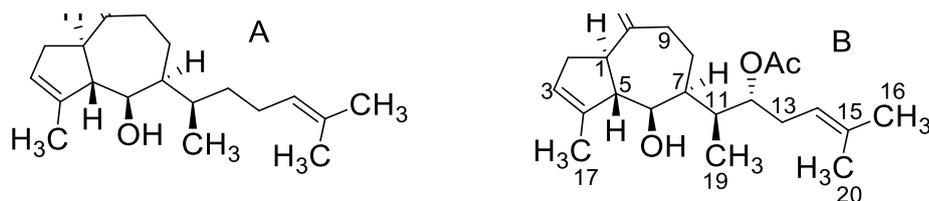


Fonte: Dados do autor

Com base nas informações discutidas e comparação com dados da literatura, conclui-se que DM-01 se trata de um diterpeno guaiano prenilado similar ao pachydictyol A (Figura 54A, p. 88) (Hirschfeld et al., 1973; Abou-El-Wafa et al., 2013), apresentando como única diferença o acréscimo do grupo acila no carbono C-12

(Figura 54B, p. 85). Em compostos já isolados no gênero *Dictyota*, a presença de um ou mais grupos acila é bastante comum, principalmente nas posições C-1, C-8, C-9, C-14 e C-15, sendo, entretanto, pouco comum na posição C-12 (Rivera *et al.*, 1987; Rosa; Stefano; Zavodnik, 1986; Kolesnikova *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2018). Diante disso, conclui-se que o composto isolado se trata de um novo derivado diterpênico, o qual foi definido como dictyol K, seguindo uma sequência de nomenclatura iniciado por Danise *et al.* (1976).

Figura 54. Representação estrutural proposta para dictyol K (B)



Fonte: Dados do autor

Tabela 13. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para DM-01 ( $\text{CDCl}_3$ , 500)

	HSQC		HMBC		HSQC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500)	
	$\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$ (J em Hz)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$ (J em Hz)
<b>1</b>	46,0	2,62 (m)		H-18	47,8	2,64 (m)
<b>2</b>	34,1	2,48; 2,22 (m)			34,9	2,25 (m); 2,21 (m)
<b>3</b>	123,7	5,32 (sl)	-	H-17	124,8	5,32 (sl)
<b>4</b>	142,1	-		H-6, H-17	143,1	-
<b>5</b>	59,1	2,58 (m)	-	H-18	61,0	2,50 (m)
<b>6</b>	74,7	3,89 (d, $J=$ 13,5)	-		78,4	3,71 (dd, $J=$ 8,3; 3,7)
<b>7</b>	46,0	1,59 (m)	-	H-19	44,3	1,83 (m)
<b>8</b>	23,2	1,57-1,52 (m)	-	H-6	23,6	1,53 (m)
<b>9</b>	40,3	2,61; 2,19 (m)	-	H-18	41,5	2,63 (m); 2,11 (m)
<b>10</b>	152,3	-	H-1; H- 18		154,0	-
<b>11</b>	37,6	1,95 (m)	H-19		39,6	1,95 (m)
<b>12</b>	76,6	4,92 (dt, $J=$ 14,7; 6,2)	H-13	H-19	78,6	4,84 (m)
<b>12'</b>	172,0	-		H-12	173,1	-
<b>12'</b>	21,3	2,05 (s)			21,2	2,01 (s)
<b>13</b>	27,7	2,27 (m)	H-14	-	30,7	2,28 (m)
<b>14</b>	119,9	5,09 (t, $J=$ 7,2)	H-13	H-20	121,0	5,14 (t, $J=$ 7,15)
<b>15</b>	134,4	-		H-13; H- 20	135,1	-
<b>16</b>	18,0	1,62 (s)		H-14, H- 20	18,1	1,63 (s)
<b>17</b>	16,0	1,82 (sl)	H-3	H-4	16,3	1,78 (s)
<b>18</b>	107,4	4,75 (sl)		H-1	107,7	4,74 (sl)
<b>19</b>	12,6	1,02 (d, $J=$ 6,8)			13,4	1,02 (d, $J=$ 6,8)
<b>20</b>	25,8	1,69 (s)		Me-16	26,1	1,68 (s)

Fonte: Dados do autor

## 4.5.1.1.2 Determinação estrutural de DM-02

O composto intitulado DM-02 (68,2 mg) foi purificado na forma de uma resina incolor, apresentando rotação específica  $[\alpha]_D^{22}$  -20.70 (c 0.07 em MeOH) e absorção no espectro ultravioleta DAD-( $\text{UV}_{\lambda\text{max}}$ ) de 202 nm (Apêndice J1-b) em metanol.

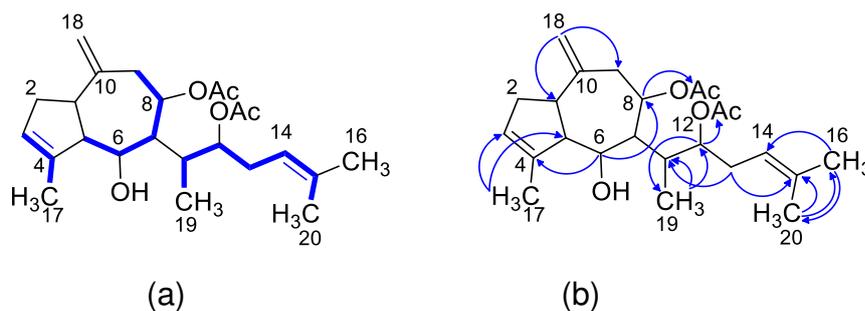
O espectro de massas de alta resolução (Apêndice K8), mostrou um pico referente ao aduto de sódio  $[M + Na]^+$  em  $m/z$  427,2458 u.m.a., compatível com a fórmula molecular  $C_{24}H_{36}O_5Na$  e  $IDH=7$ . Além do pico referente ao íon molecular, foram observados os picos em  $m/z$  367,2241 e 307,2081 u.m.a., referentes com a perda de duas unidades de ácido acético.

O espectro de RMN  $^1H$  de DM-02 ( $CD_3OD$ , 500 MHz) (Apêndice K1), mostrou-se semelhante ao de DM-01, sendo a única diferença a presença de sinais extras em  $\delta_H$  5,20 (m, H-8) e 1,98 (sl, 3H-8'') para um segundo grupo acetila (CHEN *et al.*, 2018).

No espectro de RMN  $^{13}C$  BB ( $CD_3OD$ , 125 MHz) (Apêndice K2), foram observados 24 linhas espectrais, compatíveis com um diterpeno diacetilado, em acordo com o espectro de EMAR. O padrão de hidrogenação de DM-02, foi determinado pelos espectros de RMN APT (Apêndice K3) e RMN 2D  $^1H$ ,  $^{13}C$  HSQC (Apêndice K4), classificados em 06 carbonos metílicos, 03 metilênicos, 01 metilidênico, 09 metínicos e 05 carbonos não-hidrogenados.

Os espectros de RMN 2D  $^1H$ ,  $^1H$  COSY, (Apêndice K5) e  $^1H$ ,  $^{13}C$  HMBC (Apêndice K6) confirmaram o esqueleto guaiano prenilado para o composto. As correlações entre os hidrogênios oximetínicos H-6 ( $\delta_H$  3,83) com o carbono em C-8 ( $\delta_C$  73,6) e de H-8 ( $\delta_H$  5,20) com o carbono carbonílico do grupo acila C-8' ( $\delta_C$  172,1) somados aos acoplamentos vicinais observados entre o hidrogênio H-5 ( $\delta_H$  2,53), H-6 ( $\delta_H$  3,83), H-7 ( $\delta_H$  2,10) e H-8 ( $\delta_H$  5,20) permitiram propor a estrutura mostrada na figura 55 (p. 90) onde o segundo grupo acetila está em C-8. As principais correlações e acoplamentos observados para DM-02 encontram-se sumarizados na figura 55.

Figura 55. Principais acoplamentos (a) e correlações (b) observados nos espectros de COSY e HMBC, respectivamente

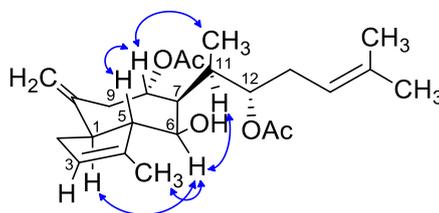


Fonte: Dados do autor

A estereoquímica relativa de DM-02 foi proposta com base nos acoplamentos dipolares observados no espectro de RMN  $^1H$ ,  $^1H$  NOESY (Apêndice

K7) e comparação com DM-01. Os acoplamentos dipolares entre o hidrogênio H-6,  $\alpha$ -posicionado, com H-1 e H-11 e do hidrogênio H-8,  $\beta$ -posicionado, com H-5, 3H-19 confirmam fusão *trans* para os anéis, assim como o  $\beta$ -posicionamento do grupo hidroxila em C-6 e  $\alpha$ -posicionamento para o grupo acetila em C-8 (Figura 56, p. 88).

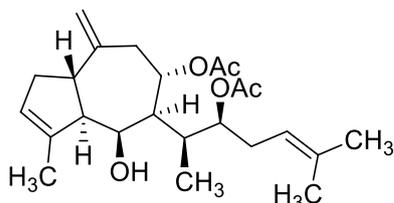
Figura 56. Principais acoplamentos dipolares observados no espectro de NOESY para DM-02



Fonte: Dados do autor

Através dos dados descritos acima em comparação com a literatura (Cheng *et al.*, 2014), conclui-se que DM-02 seja um diterpeno similar a DM-01, inédito na literatura, nomeado como dictyol M (Figura 57, p. 88).

Figura 57. Representação estrutural para DM-02



Fonte: Dados do autor

Tabela 14. Deslocamentos químicos de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de DM-02 (CD<sub>3</sub>OD, 500 MHz)

	HSQC		HMBC		DM-01	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)
<b>1</b>	48,1	2,75 (m)		H-18	47,8	2,64 (m)
<b>2</b>	36,8	2,53 (m); 2,10 (m)			34,9	2,25 (m); 2,21 (m)
<b>3</b>	124,8	5,34 (sl)		H-17	124,8	5,32 (sl)
<b>4</b>	143,6	-		H-6	143,1	-
<b>5</b>	58,9	2,53 (m)		H-17	61,0	2,50 (m)
<b>6</b>	76,8	3,83 (dd, J= 12,1; 4,6)			78,4	3,71 (dd, J= 8,3; 3,7)
<b>7</b>	44,7	2,10 (m)			44,3	1,83 (m)
<b>8</b>	73,6	5,20 (m)		H-6	23,6	1,53 (m)
<b>8'</b>	172,1	-			-	-
<b>8''</b>	21,5	1,98 (s)			-	-
<b>9</b>	42,9	2,89 (dd, J= 15,3; 1,8); 2,38 (m)		H-18	41,5	2,63 (m); 2,11 (m)
<b>10</b>	148,6	-			154,0	-
<b>11</b>	40,2	2,10 (m)	H-19	H-13	39,6	1,95 (m)
<b>12</b>	79,0	4,95 (m)	H-13		78,6	4,84 (m)
<b>12'</b>	172,4	-		H-12	173,1	-
<b>12''</b>	21,1	2,02 (br s)			21,2	2,01 (s)
<b>13</b>	31,2	2,24, t (6,5); 2,32, (m)			30,7	2,28 (m)
<b>14</b>	120,3	5,13 (m)	H-13	H-12, H-16 H-20	121,0	5,14 (t, J = 7,15)
<b>15</b>	135,0	-	H-16	H-13	135,1	-
<b>16</b>	17,9	1,61 (s)		H-14, H-20	18,1	1,63 (s)
<b>17</b>	15,2	1,79 (d, J= 1,1)		H-2, H-5	16,3	1,78 (s)
<b>18</b>	112,2	4,83 (m)			107,7	4,74 (sl)
<b>19</b>	13,4	1,00 (d, J= 6,9)		H-12	13,4	1,02 (d, J = 6,8)
<b>20</b>	26,0	1,69 (s)		H-14, H-16	26,1	1,68 (s)

Fonte: Dados do autor

## 4.5.1.1.3 Determinação estrutural de DM-03

A molécula codificada como DM-03 (1,6 mg) foi purificado na forma de uma resina incolor, apresentando rotação específica  $[\alpha]_D^{21} +10,54$  (c. 0,16) em MeOH e

absorção no espectro ultravioleta DAD-( $UV_{\lambda_{max}}$ ) de 241 nm (Apêndice J1-c) em metanol.

A fórmula molecular de DM-03 foi definida como  $C_{20}H_{30}O_3$  (IDH=6), através do espectro de massas de alta resolução, equipado com fonte de ionização por *electrospray* (EMAR-ESI) (Apêndice L7), o qual mostrou pico em  $m/z$  319,2271 u.m.a. referente ao íon molecular. Outros picos observados foram  $m/z$  301,2125 e 283,2070 u.m.a. para a perda de duas moléculas de água.

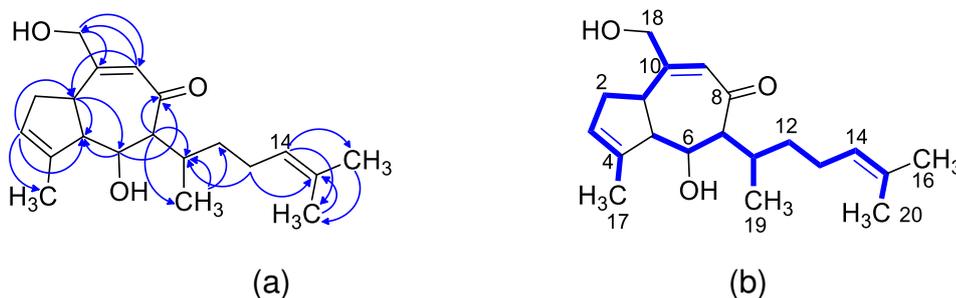
O espectro de RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 500 MHz) de DM-03 (Apêndice L1) apresentou dois sinais em  $\delta_H$  4,30 (d,  $J=16,8$  Hz) e 4,25 (d,  $J=16,8$  Hz) para hidrogênios oximetilênicos diastereotópicos e um oxi metínico em  $\delta_H$  4,06 (dd,  $J=9,4$ ; 4,4 Hz).

Os valores de carbono para DM-03 foram atribuídos com base nas projeções gerados para os espectros bidimensionais de RMN 2D  $^1H$ ,  $^{13}C$  HSQC (Apêndice L2) e HMBC (Apêndice L3), totalizando 20 sinais, condizente com a estrutura de um diterpeno.

As correlações observadas no espectro de HMBC entre os sinais dos hidrogênios H-6 ( $\delta_H$  4,06) e H-7 ( $\delta_H$  2,68) com o carbono em  $\delta_C$  206,2, sugere um grupo cetona conjugado, justificado pelo valor de 241 nm, observado no espectro UV. Já os hidrogênios oximetilênicos 2H-18 ( $\delta_H$  4,30; 4,25) e o hidrogênio vinílico H-9 ( $\delta_H$  6,21) mostraram correlações com os carbonos em  $\delta_C$  46,5 (C-1) e 163,5 (C-10), como mostrado na figura 58A (p. 93).

No espectro de RMN 2D  $^1H$ ,  $^1H$  COSY (Apêndice L4), pode-se confirmar o esqueleto guaiano prenilado para DM-03, através da sequência de acoplamentos vicinais e alílicos observados entre os hidrogênios da porção cíclica e da porção prenilada da molécula, como pode ser verificado na figura 58B.

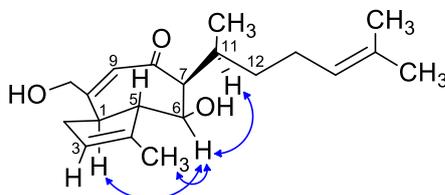
Figura 58. Correlações (a) e acoplamentos (b) exibidos pelos espectros HMBC e COSY



Fonte: Dados do autor

A estereoquímica relativa de DM-03 foi deduzida através da análise do espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  NOESY (Apêndice L5), tendo se mostrado idêntica aos compostos já relatados neste trabalho, como pode ser verificado na figura 59 (p. 91).

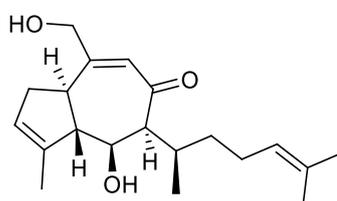
Figura 59. Principais acoplamentos dipolares para DM-03 no espectro de NOESY



Fonte: Dados do autor

Através da análise dos dados descritos acima e comparação com a literatura, conclui-se que DM-03 se trata de um diterpeno de esqueleto guaiiano prenilado inédito, similar aos compostos já relatados, nomeado como dictyol N (Figura 60).

Figura 60. Representação estrutural de DM-03



Fonte: Dados do autor

Tabela 15. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DM-03 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)

	HSQC		HMBC		DM-01	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)
<b>1</b>	46,5	3,07, (m)		H-3, H-9	47,8	2,64 (m)
<b>2</b>	33,5	2,56, (dd, $J=$ 14,8; 8,5); 2,32 (m)			34,9	2,25 (m); 2,21 (m)
<b>3</b>	124,7	5,42 (sl)			124,8	5,32 (sl)
<b>4</b>	143,3	-			143,1	-
<b>5</b>	61,9	2,31 (m)		H-1, H-3, H-6	61,0	2,50 (m)
<b>6</b>	71,2	4,06 (dd, $J=$ 9,4; 4,4)		H-1	78,4	3,71 (dd, $J=$ 8,3; 3,7)
<b>7</b>	62,8	2,68 (dd, $J=$ 10,6; 4,4)			44,3	1,83 (m)
<b>8</b>	206,2	-	H-7	H-6	23,6	1,53 (m)
<b>9</b>	129,1	6,21 (sl)		H-18	41,5	2,63 (m); 2,11 (m)
<b>10</b>	163,5	-	H-18		154,0	-
<b>11</b>	29,4	2,34 (m)	H-7	H-13, 3H- 19	39,6	1,95 (m)
<b>12</b>	33,3	1,70 (m); 1,20 (m)		3H-19	78,6	4,84 (m)
<b>12'</b>					173,1	-
<b>12''</b>					21,2	2,01 (s)
<b>13</b>	25,5	2,29 (m); 1,81 (m)			30,7	2,28 (m)
<b>14</b>	125,5	5,17 (t, $J=$ 7,1)		3H-16, 3H- 20	121,0	5,14 (t, $J=$ 7,1)
<b>15</b>	142,6	-		H-13, 3H- 16, 3H-20	135,1	-
<b>16</b>	17,5	1,61 (s)		H-14, 3H- 20	18,1	1,63 (s)
<b>17</b>	15,5	1,81 (s)		H-3	16,3	1,78 (s)
<b>18</b>	63,8	4,30 (d, $J=$ 16,8) 4,25 (d, $J=$ 16,8)		H-9	107,7	4,74 (sl)
<b>19</b>	18,1	0,84 (d, $J=$ 6,5)		H-7	13,4	1,02 (d, $J=$ 6,8)
<b>20</b>	25,5	1,68 (s)		H-14, 3H- 16	26,1	1,68 (s)

Fonte: Dados do autor

#### 4.5.1.2. Determinação estrutural dos metabólitos obtidos do extrato acetato de etila de *D. menstrualis*

O fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila da alga parda *D. menstrualis* resultou no isolamento e caracterização de cinco (05) compostos, codificados como DM-04 a DM-08 (subitem 4.4.1.2., p. 80).

##### 4.5.1.2.1. Determinação estrutural de DM-04

DM-04 (38,8 mg) foi purificado sob a forma de uma resina amarela, apresentando rotação específica  $[\alpha]_D^{21} +28.05$  (c. 0,2 MeOH) e absorção no espectro ultravioleta DAD-(UV $_{\lambda_{max}}$ ) de 230 nm (Apêndice J1-d) em metanol.

O espectro de massas foi obtido por CG EM (Apêndice M6), mostrou o qual mostrou o pico em  $m/z$  360 u.m.a., referente ao íon molecular. A fórmula molecular  $C_{22}H_{32}O_4$  (IDH= 7) foi deduzida pela combinação dos espectros de massas e RMN  $^{13}C$  BB APT.

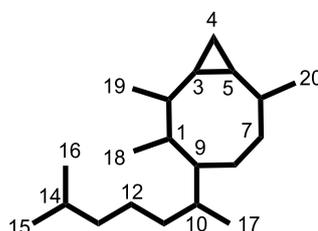
O espectro de RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 300 MHz) de DM-04 (Apêndice M1) apresentou um único sinal para hidrogênio olefínico ( $\delta_H$  5,11; m) indicando uma dupla ligação tri substituída. Sinais em  $\delta_H$  4,96 (dd,  $J= 17,5; 2,8$  Hz) e 4,73 (dd,  $J= 17,5; 2,8$  Hz) para hidrogênios oximetilênicos diastereotópicos, e um sinal para hidrogênio oximetínico em  $\delta_H$  5,46 (sl). Além disso mostrou sinais para cinco grupos de hidrogênios metílicos, sendo dois ligados a carbonos olefínicos ( $\delta_H$  1,68 e 1,60), dois dupletos em  $\delta_H$  1,03 (d,  $J= 6,6$  Hz) e 0,99 (d,  $J= 6,0$  Hz) e uma metila para grupo acetila em  $\delta_H$  2,03 (s). Adicionalmente foram observados sinais em  $\delta_H$  0,24 (m) e 0,99 (m), característicos de hidrogênios metilênicos do anel ciclopropânico, os quais mostraram correlação, no espectro de HSQC, com o carbono em  $\delta_C$  9,1 (C-4) confirmando a presença de um anel ciclopropânico dissubstituído.

O espectro de RMN  $^{13}C$  BB ( $CD_3OD$ , 75 MHz) (Apêndice M2), apresentou 22 linhas espectrais, sugerindo um diterpeno possuindo um grupo acetila, justificado pelos sinais em  $\delta_C$  171,6 (C-8') e 21,0 (C-8''). Foram observados sinais para uma carboxila de lactona C-19 ( $\delta_C$  176,6) e duas ligações duplas em  $\delta_C$  169,6 (C-1), 133,1 (C-14), 129,5 (C-2) e 125,0 (C-13). Os espectros de RMN  $^{13}C$  APT (Apêndice M3) e RMN 2D  $^1H$ ,  $^{13}C$  HSQC (Apêndice M4) foram utilizados para definir o padrão de

hidrogenação de cada carbono, como sendo 5 carbonos metílicos, 5 metilênicos, 7 metínicos e 5 não-hidrogenados.

O espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (Apêndice M5), confirmaram a presença de uma  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada através das correlações entre os hidrogênios oximetilênicos diastereotópicos em  $\delta_{\text{H}}$  4,96 (dd,  $J= 17,5; 2,8$  Hz; H-18a) e 4,73 (dd,  $J= 17,5; 2,8$  Hz; H-18b) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  169,6 (C-1), 129,5 (C-2) e 176,6 (C-19), sendo estes característicos de diterpenos de esqueleto crenulidano (Figura 61, p. 96), os quais são formados por um sistema bicíclico do tipo [6.1.0] nonano (Wang; Pinard; Paquette, 1996). Essa estrutura base foi primeiramente identificada por Sun, McEnroe e Fenical (1982) a partir de estudos com a alga parda *D. crenulata*. Posteriormente foi obtido de outras espécies do gênero (Chen *et al.*, 2018).

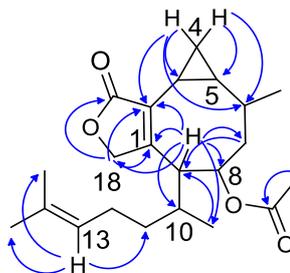
Figura 61. Estrutura básica de diterpenos de esqueleto crenulidano



Fonte: Dados do autor

Ainda no espectro de HMBC, as correlações entre o hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  3,33 (H-9) com os carbonos da  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada (C-1, C-2 e C-18), C-17 ( $\delta_{\text{C}}$  17,7) e C-8 (73,5) e C-10 ( $\delta_{\text{C}}$  33,8), juntamente com outras correlações sumarizadas na figura 62 (p. 96) suportam a proposta estrutural mostrada abaixo.

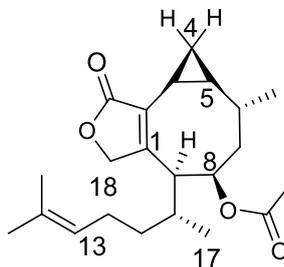
Figura 62. Principais correlações observadas no espectro de HMBC para DM-04



O espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  NOESY (Apêndice M7) mostrou apenas acoplamentos dipolares entre os hidrogênios  $\delta_{\text{H}}$  3,33 (H-9) e 1,03 (H-17), sendo a estereoquímica dos demais centros atribuídos por comparação com os dados propostos por Wang, Pinard e Paquette (1996) que deduziram a estereoquímica

absoluta do acetoxicrenulídeo (Figura 63, p. 95) a partir de técnicas de cristalografia de raio-X.

Figura 63. Representação estrutural para DM-04



Fonte: Dados do autor

Pesquisas realizadas na literatura sobre o gênero *Dictyota* mostraram que os dados descritos para o composto são compatíveis com o diterpeno conhecido como acetoxicrenulídeo (Figura 63, p. 97), previamente isolado por Sun, McEnroe e Fennical (1982). Guella e Pietra (1993) propuseram que os diterpenos de esqueleto crenulidano sejam formados a partir de reações de foto isomerização de diterpenos de esqueleto xenicano (Figura 42, p. 74).

Tabela 16. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para DM-04 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ),

	HSQC		HMBC		* Literatura ( $\text{CDCl}_3$ )	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)
<b>1</b>	169,6	-	H-9; 2H-18		166,5	-
<b>2</b>	129,5	-		2H4; H9; 2H-18	128,8	-
<b>3</b>	11,1	1,50 (m)			10,3	
<b>4</b>	9,1	0,99 (m); 0,24			8,4	0,89 (m); 0,39 (m)
<b>5</b>	26,8	0,99 (m)		3H-20	25,9	
<b>6</b>	30,4	1,21 (m)		2H-4	29,3	
<b>7</b>	44,6	1,88 (m)			43,9	
<b>8</b>	73,5	5,46 (sl)	H7; H9		72,2	5,48 (t, $J= 4$ )
<b>8'</b>	171,6	-	H-8''		169,7	-
<b>8''</b>	21,0	2,03 (s)			21,3	2,03
<b>9</b>	48,0	3,33 (m)			47,4	3,27 (d, $J= 7,5$ )
<b>10</b>	33,8	1,63 (m)	3H-17		32,8	
<b>11</b>	36,5	1,29; 1,21 (m)		3H-17	35,7	
<b>12</b>	26,3	2,03 (m)			25,7	
<b>13</b>	125,0	5,11 (m)			123,5	5,07 (t, $J= 7,5$ )
<b>14</b>	133,1	-			132,4	-
<b>15</b>	25,8	1,68 (s)		H-13	25,5	1,70 (s)
<b>16</b>	17,3	1,60 (s)		H-9	17,1	1,59 (s)
<b>17</b>	17,7	1,03 (d, $J= 6,6$ )		H-13	17,7	1,02 (d, $J= 7,5$ )
<b>18</b>	73,4	4,96; 4,73 (dd, $J=17,5; 2,8$ )			71,5	4,85; 4,74 (dd, $J= 16; 2,5$ )
<b>19</b>	176,6	-		2H-18	174,2	
<b>20</b>	23,6	0,99 (s)			23,4	0,99 (d, $J= 5$ Hz)

Fonte: Dados do autor \* Sun, McEnroe e Fennical (1982).

#### 4.5.1.2.2. Determinação estrutural de DM-05

DM-05 (11,3 mg), obtido na forma de uma resina amarela, apresentou rotação específica  $[\alpha]_D^{21} - 12.33$  (c. 0,2 MeOH) e absorção no espectro ultravioleta DAD-( $\text{UV}_{\lambda_{\text{max}}}$ ) de 230 nm (Apêndice J1-e) em metanol.

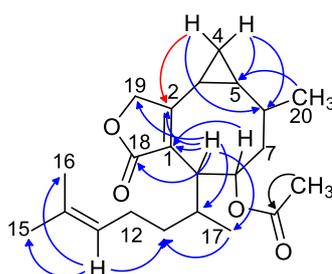
O espectro de massas de DM-05 foi obtido por CG EM (Apêndice N6), mostrou pico para o íon molecular em  $m/z$  360 u.m.a., que aliado aos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e APT, foi compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_4$  com (IDH= 7).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) de DM-05 (Apêndice N1), apresentou padrão de distribuição dos sinais similar ao DM-04, sendo as principais diferenças nos deslocamentos químicos dos sinais em  $\delta_H$  2,96 (d,  $J= 11,7$  Hz, H-9), 2,40 (m, H-10) e 0,96 (m, H-4).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) (Apêndice N2) de DM-05 apresentou 22 linhas espectrais, condizente com um diterpeno acetilado como evidenciado pelos deslocamentos químicos em  $\delta_{\text{C}}$  172,7 (C-8') e 21,1 (C-8''). Os sinais de carbono em  $\delta_{\text{C}}$  176,9 (C-18), 169,5 (C-2), 132,1 (C-1) indicaram uma  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, enquanto os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  27,7 (C-5), 14,4 (C-3), 8,4 (C-4) foram sugestivos de anel ciclopropânico. Como já mencionado, os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  APT (Apêndice N3) e RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  HSQC (Apêndice N4) mostraram o mesmo padrão de hidrogenação apresentado por DM-04, mas com pequenas diferenças nos deslocamentos químicos.

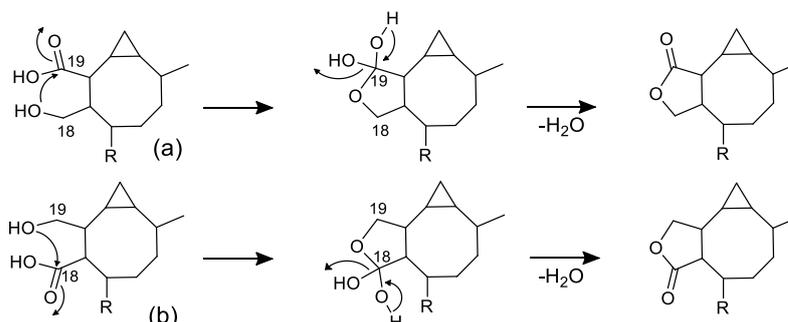
Como esperado, as correlações observadas no espectro de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (Apêndice N5) indicaram que DM-05 também se trata de um diterpeno crenulidano, conforme sumarizadas na figura 64 (p. 99). A principal diferença entre DM-05 e o acetoxicrenulídeo (DM-04) foi verificada entre as correlações dos hidrogênios metilênicos do anel ciclopropânico em  $\delta_{\text{H}}$  0,36 (m) e 0,97 (m) com o carbono beta ( $\beta$ ) da  $\gamma$ -lactona (169,5), diferente do observado para DM-04, cuja correlação era com o carbono- $\alpha$ . Isto indica que DM-05 se trata de um isômero de posição de DM-04, uma vez que ambos os compostos podem ser formados a partir de uma reação de esterificação, como pode ser visto na figura 65 (p. 100).

Figura 64. Principais correlações observadas no espectro de HMBC para DM-05



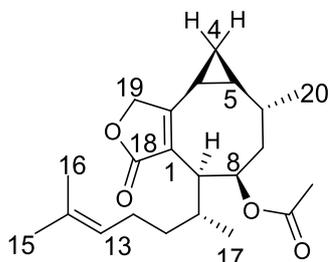
Fonte: Dados do autor

Figura 65. Proposta biossintética para formação dos diterpenos acetoxicrenulídeo (a) e Isoacetoxicrenulatina (b)



Por fim, a estereoquímica relativa foi proposta com base na comparação entre os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DM-05 com os valores obtidos da literatura (Ishitsuka *et al.*, 1983; Cheng *et al.*, 2014) e pelo acoplamento dipolar observado entre os hidrogênios H-9 com os metílicos 3H-17. Desta forma, a estrutura completa de DM-05 foi determinada de acordo como mostrado na figura 66.

Figura 66. Representação estrutural para DM-05



Fonte: Dados do autor

Pesquisas realizadas na literatura mostram que o composto em questão, se trata do diterpeno isoacetoxicrenulatina, previamente isolado da alga parda *Pachydictyol coriaceum* (Ishitsuka *et al.*, 1983).

Tabela 17. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DM-05 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300)

	HSQC		HMBC		*Lit. ( $\text{CDCl}_3$ 90)	
	$\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$ (J em Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\bar{\delta}_C$	$\bar{\delta}_H$ (J em Hz)
1	132,1	-	H-9	H-8, H-19ab	131,1	-
2	169,5	-	H-19ab	H-4a, H-9	162,4	-
3	14,4	1,81 (m)	H-4a	-	13,2	1,80 (m)
4	8,4	0,36 (dd, $J=$ 10,7, 5,2); 0,97	-	-	7,9	0,18 (m) 0,89 (m)
5	27,5	0,97 (m)	-	Me-20	25,7	0,53 (m)
6	31,4	1,17 (m)	Me-20	H-4a, H-8,	29,8	0,89 (m)
7	45,9	1,79 (m), 1,74	-	Me-20, H-9	44,8	-
8	72,8	5,52 (t, $J=$ 3,6)	H-9	-	70,9	5,05 (t, $J=$ 5)
8'	172,7	-	-	Me-8''	-	-
8''	21,1	1,91 (s)	-	-	-	1,87 (s)
9	48,0	2,96 (d, $J=$ 11,7)	-	Me-17	46,8	2,73 (d, $J=$ 11)
10	31,0	2,40 (m)	H-9, Me-17	-	30,1	2,36 (m)
11	36,6	1,17 (m), 0,97	-	Me-17	35,6	0,89 (m)
12	25,9	1,90 (m), 1,83	-	-	26,4	-
13	125,7	5,01(t, $J=$ 7,17)	-	Me-15, Me- 16	124,7	4,95 (t, $J=$ 7)
14	132,1	-	Me15, Me16	-	131,5	-
15	25,9	1,55 (s)	-	H13, Me-16	24,7	1,52 (s)
16	18,2	1,63 (d, $J=$ 1,1)	-	H13, Me-15	17,5	1,61 (s)
17	17,7	1,09 (d, $J=$ 6,4)	-	H-9	18,0	0,90 (d, $J=$ 6)
18	176,9	-	-	H-9, H-19ab	173,8	-
19	73,2	4,86 (d, $J=$ 18,0) 4,72 (d, $J=$ 18,0)	-	2H-18	71,3	4,66; 4,40 (d, $J=$ 16)
20	24,1	1,02 (d, $J=$ 6,2)	-	-	23,7	0,98 (d, $J=$ 7)

Fonte: Dados do autor

\*ISHITSUKA *et al.*, 1983.

## 4.5.1.2.3. Determinação estrutural de DM-06

O composto codificado como DM-06 (13,4 mg) foi obtido na forma de uma resina amarela, com rotação específica  $[\alpha]_D^{21} + 31,8$  (c. 0,2 em MeOH) e absorção no espectro ultravioleta DAD-( $\text{UV}_{\lambda_{\text{max}}}$ ) de 230 nm (Apêndice J1-f) em metanol.

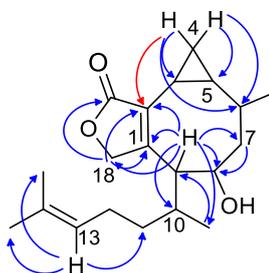
A fórmula molecular de DM-06 foi deduzida a partir do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  e CGEM (Apêndice O4), o qual mostrou um pico correspondente ao íon molecular em  $m/z$  318 u.m.a., compatível com a fórmula  $\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$  a qual apresenta  $\text{IDH} = 6$ .

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz) de DM-06 (Apêndice O1), mostrou-se semelhante aos espectros dos compostos DM-04 e DM-05, porém sem os sinais para grupos acetila.

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  BB ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz) de DM-06 (Apêndice O2), apresentou 20 linhas espectrais, cujos deslocamentos químicos foram semelhantes aos dos compostos acetoxicrenulídeo (DM-04) e isoacetoxicrenulatina (DM-05).

O espectro de RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC (Apêndice O3) foi fundamental para definir a estrutura final de DM-06. A correlação entre o sinal do hidrogênio metilênico do anel ciclopropânico em  $\delta_{\text{H}}$  0,26 (sl) com o carbono- $\alpha$  da  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $\delta_{\text{C}}$  128,7) indicou que o composto em discussão apresenta estrutura semelhante ao acetoxicrenulídeo (DM-04), mas contendo o grupo hidroxila livre em vez de acetilado. A confirmação da posição do grupo hidroxila em C-8 foi evidenciada pelo valor do deslocamento químico de H-8 em  $\delta_{\text{H}}$  4,28 (sl) mais protegido do que seu correspondente em DM-04 ( $\delta_{\text{H}}$  5,46), bem como pelas correlações dos hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3,16 (H-9) e 1,81 (H-7) com o carbono em  $\delta_{\text{C}}$  70,2 (C-8). As demais correlações encontram-se sumarizadas na figura 67 (p. 100).

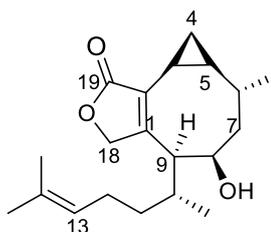
Figura 67. Principais correlações observadas no espectro de HMBC para DM-06



Fonte: Dados do autor

A comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DM-06 com os dados descritos na literatura mostram que o composto em análise corresponde ao diterpeno conhecido como 8-hidroxicrenulídeo, previamente isolado de *D. crenulata* (Midlard; Wing; Sims, 1882).

Figura 68. Representação estrutural de DM-06



Fonte: Dados do autor

O diterpeno de esqueleto crenulidano acetoxicrenulídeo (DM-04), isolado de *D. crenulata* por Sun, McRoe e Fenical (1982) foi o primeiro exemplo relatado para esse esqueleto, posteriormente isolou-se outros compostos, entre os quais incluem isoacetoxicrenulatina (DM-05) e 8-hidroxicrenulídeo (DM-06). Esses compostos geralmente apresentam propriedades *anti-microfouling*, anti-inflamatório e potente atividade piscicida, que inibe a predação da espécie por peixes e outros organismos marinhos (Chen *et al.*, 2018).

Tabela 18. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DM-06 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300)

	HSQC		HMBC		Lit* ( $\text{CDCl}_3$ , 500)	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)
1	168,8	-	H-9; 2H-18		168,5	-
2	128,7	-		H-4; H-9; 2H-18	128,1	-
3	10,9	1,46 (m)	H-4		10,2	1,3 (m)
4	8,9	0,96 (m); 0,26 (m)			8,2	0,33 (m)
5	27,2	0,96 (m)	H-4	3H-20	26,1	-
6	29,6	1,18 (m)		2H-4	28,5	1,3 (m)
7	49,0	1,81 (m)		H-9	48,6	1,9 (m)
8	70,2	4,28 (sl)	H7; H9		70,0	4,34 (m)
9	50,6	3,16 (d, $J= 8,7$ )		H-7, 3H-17	48,9	3,09 (d, $J= 8,1$ )
10	33,6	1,77 (m)	3H-17		32,9	1,9(m)
11	36,8	1,34 (m); 1,18 (m)			35,8	1,3 (m)
12	26,3	2,13 (m)		3H-17	25,7	1,9 (m)
13	125,1	5,13 (t, $J= 5,8$ )			123,8	5,08 (t, $J= 7$ )
14	132,9	-			132,3	-
15	25,8	1,68 (s)		H-13	25,6	1,71 (s)
16	18,3	1,60 (d, $J= 1,1$ )		H-9	17,7	1,62 (s)
17	17,7	1,06 (d, $J= 6,6$ )		H-13	17,4	1,05(d, $J=7,3$ )
18	74,0	5,03 (dd, $J= 17,5$ ; 2,6); 4,75 (dd, $J=$ 17,5; 2,6)		H-9	72,3	5,01 (dd, $J=17$ ; 3); 4,67 (dd, $J=17$ ; 3)
19	177,2	-		2H-18	174,7	-
20	24,0	1,01(d, $J= 7,0$ )			23,7	1,02(d, $J=7,3$ )

Fonte: Dados do autor

\*Midlard; Wing; Sims, (1882)

#### 4.5.1.2.4. Determinação estrutural de DM-07

O composto codificado como DM-07 (4,8 mg) foi obtido na forma de uma resina incolor. Este apresentou rotação específica  $[\alpha]_D^{21} + 7,51$  (c. 0,2 em MeOH) e absorção no espectro ultravioleta DAD-(UV $_{\lambda_{max}}$ ) de 202 nm (Apêndice J1-g) em metanol.

O espectro de massas CG MS (Apêndice P7) apresentou um pico correspondente ao íon molecular em  $m/z$  306 u.m.a., indicando a fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>34</sub>O<sub>2</sub> a qual apresenta IDH= 4.

O espectro de RMN <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 300 MHz) de DM-07 (Apêndice P1), apresentou dois sinais para hidrogênios ligados a carbonos olefínicos em  $\delta_H$  5,43 (s) e 5,14 (t,  $J= 7,2$  Hz), um sinal para hidrogênio oximetínico em  $\delta_H$  4,12 (d,  $J= 10$  Hz), além de sinais para grupos metílicos em  $\delta_H$  1,72 (sl); 1,67 (d,  $J= 1,2$ ); 1,61 (sl); 1,13 e 1,02 (d,  $J= 1,2$ ).

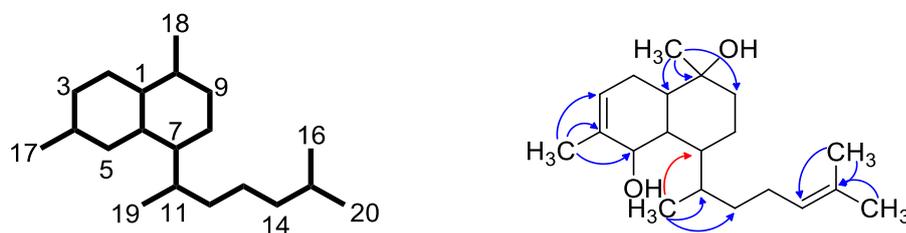
O espectro de RMN <sup>13</sup>C BB (CD<sub>3</sub>OD, 75 MHz) de DM-07 (Apêndice P2), apresentou 20 linhas espectrais, sugestivo de um composto diterpenico. Foram observados sinais para quatro carbonos olefínicos em  $\delta_C$  137,0; 131,8; 126,1 e 125,5, bem como dois sinais para carbonos oximetínicos em  $\delta_C$  71,3 e 71,1. Os espectros de RMN <sup>13</sup>C APT (Apêndice P3) e HSQC (Apêndice P4) foram utilizados para definir o padrão de hidrogenação dos carbonos como sendo 05 carbonos metílicos, 05 metilênicos, 07 metínicos e 03 carbonos não-hidrogenados.

A comparação entre os dados descritos acima e os dos compostos anteriormente relatados, neste trabalho, indicam que DM-07 seja um diterpeno com esqueleto diferente daqueles já abordados, embora contenha a mesma porção acíclica 2-metil-hept-2-eno, o qual foi comparado pelo espectro de HMBC (Apêndice P5), através das correlações entre os hidrogênios metílicos em  $\delta_H$  1,61 (sl, 3H-16) e 1,67 (d,  $J= 1,2$ ; 3H-20) com os carbonos em  $\delta_C$  126,1 (C-14) e 131,8 (C-15), comum para os diterpenos do grupo I (grupo dos sesquiterpenos prenilados) (CHENG *et al.*, 2014).

As correlações das metilas em  $\delta_H$  1,72 (sl, 3H-17) e 1,13 (s, 3H-18) com os carbonos oximetínicos em  $\delta_C$  71,3 (C-5) e 71,1 (C-10) e olefínicos em  $\delta_C$  123,3 (C-3) e 137,0 (C-4) sugerem um anel bicíclico do tipo decalina com dois grupos hidroxila posicionados nos carbonos C-5 e C-10 (Figura 69, p. 104), característico de diterpenos

que apresentam esqueleto do tipo cadinano prenilado (Ishitsuka *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 2018).

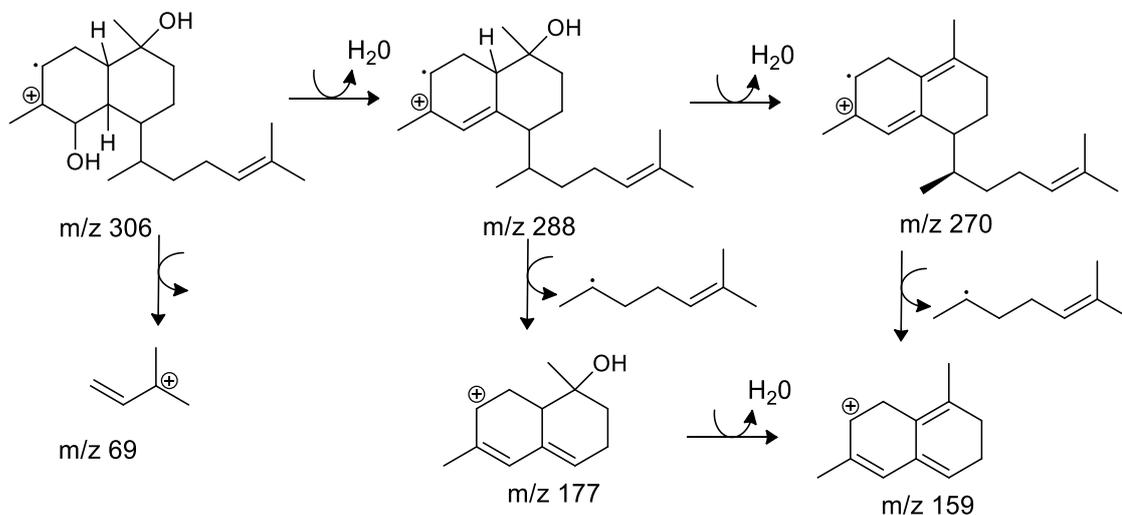
Figura 69. Representação estrutural do esqueleto base cadinano prenilado (a) e correlações observadas no espectro HMBC (b)



Fonte: Dados do autor

O padrão de fragmentação da molécula foi estabelecido através dos picos observados em  $m/z$  306 ( $M^+$ ), 288 ( $M^+ - H_2O$ ), 270 ( $M^+ - 2H_2O$ ) e 159 ( $M^+ - 2H_2O - C_8H_{15}$ ) pico base, como pode ser visto na figura abaixo.

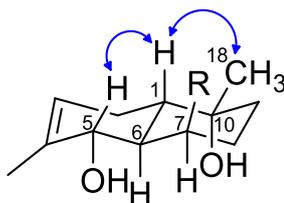
Figura 70. Principais fragmentos observados no espectro de EMAR para DM-07



Fonte: Dados do autor

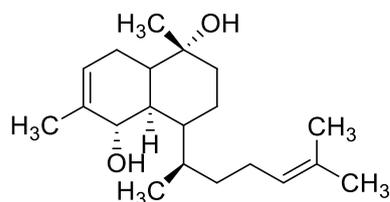
A estereoquímica relativa foi atribuída a partir do espectro de RMN  $^1H$ ,  $^1H$  NOESY (Apêndice P6) através dos acoplamentos dipolares entre os hidrogênios em  $\delta_{H4,12}$  (H-5); 1,91 (H-1) e 1,13 (3H-18), sugerindo uma orientação comum para ambas as hidroxilas nos carbonos C-5 e C-10. A fusão *trans* para os anéis da decalina, assim como as demais configurações relativas foram atribuídas com base na comparação dos dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  de DM-07 com os dados relatados por Ishitsuka *et al.* (1990), mostrando que o composto em questão se trata do diterpeno dictyotina A (Figura 71, p. 104), previamente isolada de *D. dichotoma* (Koleniskova, *et al.*, 2006).

Figura 71. Estereoquímica relativa proposta para DM-07



Fonte: Dados do autor

Figura 72. Representação estrutural de DM-07



Fonte: Dados do autor

Pesquisas realizadas na literatura mostraram que diterpenos de esqueleto cadinano prenilado são comuns em algas pardas da família Dictyotaceae (Ishitsuka *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 2018), embora apenas cinco compostos tenham sido relatados para espécies do gênero *Dictyota* (Kolesnikova *et al.*, 2006).

Tabela 19. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para DM-07 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )

	HSQC		HMBC		Literatura* (Pyr-d <sup>5</sup> 500 MHz)	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)
<b>1</b>	42,9	1,74 (m)		3H-18	41,0	1,80 (ddd, $J= 12; 11, 6$ )
<b>2</b>	26,1	2,07 (m)			24,5	2,56 (dd, $J= 18; 11$ ); 2,13 (m)
<b>3</b>	123,5	5,43 (sl)		3H-17	121,1	5,48 (sl)
<b>4</b>	137,0	-	3H-17		136,2	-
<b>5</b>	71,3	4,12 (d, $J= 10,0$ )			68,8	4,39 (d)
<b>6</b>	44,6	1,91 (m)			43,2	2,46 (m)
<b>7</b>	35,9	2,01 (m)			34,1	2,45 (m)
<b>8</b>	21,8	1,79 (m)			20,3	2,15 (tt, $J= 13; 1,5$ ); 1,76 (dtd, $J= 13; 3,5;$ 1,5)
<b>9</b>	39,1	1,34 (m)		3H-18	37,2	1,65 (m)
<b>10</b>	71,1	-	3H-18		67,9	-
<b>11</b>	33,0	1,98 (m)	3H-19		31,0	2,18 (m)
<b>12</b>	38,5	1,61 (m); 1,31 (m)		3H-19	37,2	1,63 (m); 1,33 (m)
<b>13</b>	27,5	2,10 (m)			25,6	2,05 (m); 1,97 (m)
<b>14</b>	126,1	5,18 (t, $J= 7,2$ )		3H-16; 3H-20	124,4	5,16 (tl)
<b>15</b>	131,8	-	3H-16; 3H-20		129,3	-
<b>16</b>	17,7	1,61 (sl)		3H-20	16,3	1,48 (sl)
<b>17</b>	19,9	1,72 (sl)			19,0	1,92 (sl)
<b>18</b>	28,8	1,13 (s)			28,0	1,23 (s)
<b>19</b>	19,8	1,02 (d, $J= 7,0$ )			18,2	1,03 (d, $J= 7$ )
<b>20</b>	25,8	1,67 (d, $J= 1,2$ )		3H-16	24,4	1,54 (sl)

Fonte: Dados do autor

\*Ishitsuka *et al.*, 1990.

## 4.5.1.2.5. Determinação estrutural de DM-08

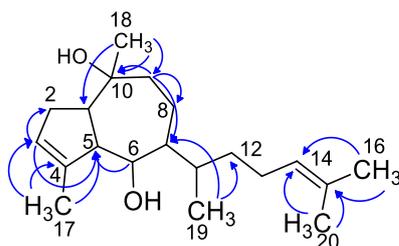
O composto codificado como DM-08 (10,0 mg) foi obtido como uma resina incolor, apresentando rotação específica  $[\alpha]_D^{21} + 18,08$  (c. 0,2 em MeOH) e absorção no espectro ultravioleta DAD-( $\text{UV}_{\lambda\text{max}}$ ) de 202 nm em metanol (Apêndice J1-h).

A fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$  foi obtida pela combinação dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  e por espectrometria de massas CGEM (Apêndice Q4), através do pico para o íon molecular em  $m/z$  306 u.m.a., a qual apresenta IDH=4.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300 MHz, Apêndice Q1) e RMN  $^{13}\text{C}$  BB ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 75 MHz, Apêndice Q2), apresentaram perfil de distribuição de seus sinais semelhante aos de DM-01, porém sem os sinais para a dupla ligação exocíclica e para o grupo acetila.

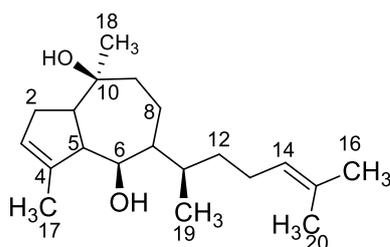
No espectro de RMN 2D  $^1\text{H},^{13}\text{C}$  HMBC (Apêndice Q3) foram observadas as correlações características para diterpenos de esqueleto guaiano prenilado, resumidos na figura 73 (p. 107). As correlações entre o grupo metila em  $\delta_{\text{H}}$  1,16 (sl, 3H-18) com os carbonos em  $\delta_{\text{C}}$  51,6 (C-1), 47,8 (C-9) e 73,3 (C-10) sugerem a presença de um segundo grupo hidroxila ligado ao carbono não-hidrogenado C-10.

Figura 73. Principais correlações observadas no espectro de HMBC para DM-08



Pesquisas realizadas na literatura mostraram que o composto em questão se trata do diterpeno dictyol C (Figura 74, p. 106), inicialmente isolado das glândulas digestivas do molusco gastrópode conhecido como “lebre do mar depilatório” *Aplysia depilans* e da alga parda *D. dichotoma* por Danise *et al.* (1976). Esse achado revelou que os diterpenos isolados de moluscos são provenientes de sua alimentação. Dictyol C também foi isolado de *D. dentata* (Alarado; Gerwick, 2004) e *D. divaricata* (König; Wright; Sticher, 1991). Estudos mostraram que o dictyol C apresenta efeito protetor do DNA, antitumoral, antioxidante e anti-incrustante (Ayyad *et al.*, 2011).

Figura 74. Representação estrutural para DM-08



Fonte: Dados do autor

Tabela 20. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DM-08 (( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 300)

	HSQC		HMBC		*Literatura $\text{CDCl}_3$ 100 MHz	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)
1	51,6	2,20 (m)	-	3H-18	50,0	2,21 (m)
2	33,7	2,31 (m); 2,13 (m)	H-3	-	32,9	-
3	124,0	5,22 (sl)	-	3H-17	123,2	5,26 (d)
4	144,1	-	3H-17	H-6	142,7	-
5	53,4	2,88 (m)	H-6	H-3; 3H-17	52,7	2,74 (m)
6	76,4	3,75 (dd, $J= 8,6;$ 3,8)	-	-	74,4	3,87 (d, $J= 9$ )
7	50,1	1,36 (m)	-	H-9; 3H-19	49,1	-
8	20,6	1,22 (m)	H-9	H-6	19,7	-
9	47,8	1,92 (dd, $J= 7,1;$ 1,7)	-	3H-18	46,6	-
10	73,3	-	H-9; 3H-18	-	72,4	-
11	36,0	2,31 (m)	3H-19	-	34,5	-
12	36,2	1,60 (m) 1,40 (m)	-	3H-19	34,8	-
13	26,5	2,01	-	-	25,5	-
14	126,2	5,15 (t, $J= 7,1$ )	-	3H-16; 3H-20	124,7	5,14 (t, $J= 6$ )
15	131,6	-	3H16; 3H-20	-	131,2	-
16	25,8	1,60 (d, $J= 1,1$ )	-	H-14	25,6	1,62 (s)
17	16,6	1,80 (sl)	-	-	16,2	1,85 (s)
18	30,2	1,16 (s)	-	-	30,0	1,22 (s)
19	17,6	0,98 (d, $J= 6,1$ )	-	-	17,4	1,00 (d, $J= 6$ )
20	17,7	1,67 (s)	-	H-14	17,6	1,70 (m)

Fonte: Dados do autor \*Danise *et al.*, 1976.

#### 4.5.2. Determinação estrutural dos compostos isolados de *Dictyota mertensii*

##### 4.5.2.1. Determinação estrutural dos metabólitos obtidos do extrato acetato de etila da alga parda *Dictyota mertensii*

A partir do fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila (3,5 g) da alga parda *D. mertensii*, isolou-se e caracterizou-se 5 compostos codificados como DM-09, DM-10, DM-11, DM-12 e DM-13 (p. 82).

##### 4.5.2.1.1. Determinação estrutural de DM-09

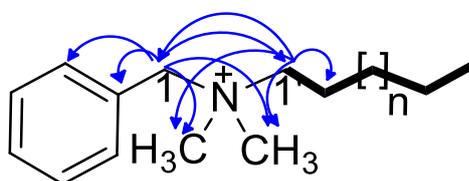
O composto denominado DM-09 foi isolado na forma de uma resina de coloração amarela, apresentando rotação específica de  $[\alpha]_D^{21} + 58,23^\circ$  (c. 0,1 MeOH) e absorção do espectro de ultravioleta DAD-( $UV_{\lambda_{max}}$ ) 208 nm (Apêndice J1-i).

A caracterização estrutural de DM-09 foi realizada através da análise de seus espectros de RMN uni e bidimensionais, onde se observou no espectro de RMN  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 300 MHz) (Apêndice R1) sinais em  $\delta_H$  7,57 ppm, integrados para cinco hidrogênios, condizentes com um anel benzênico monossustituído. Verificou-se também dois sinais para hidrogênios ligados a carbonos metilênicos em  $\delta_H$  4,53 e 3,34 próximos a átomo eletronegativo, juntamente com um sinal intenso em  $\delta_H$  3,02 ppm, integrado para seis hidrogênios o qual foi atribuído a duas metilas. Por fim, os sinais em  $\delta_H$  1,39; 1,29 e 0,97 indicam a presença de cadeia alifática saturada.

Nos espectros de RMN de  $^{13}C$  BB ( $CD_3OD$ , 75 MHz) (Apêndice R2),  $^{13}C$  APT (Apêndice R3) e 2D  $^1H$ ,  $^1H$  HSQC (Apêndice R4) confirmou-se a existência do anel benzênico monossustituído através dos sinais na faixa de  $\delta_C$  134,2 - 129,04 ppm, assim como da cadeia longa de hidrocarboneto saturada através dos valores de sinais para carbonos metilidênicos na faixa de  $\delta_C$  33,8 - 27,5 ppm para carbonos metilênicos.

Através da análise dos espectros bidimensionais de RMN  $^1H$ ,  $^1H$  COSY (Apêndice R5) pode-se determinar a estrutura básica de DM-09, através dos acoplamentos entre os sinais de hidrogênio atribuídos a cadeia alifática saturada ( $\delta_H$  1,39; 1,88) com hidrogênios metilênicos ligados a um heteroátomo em  $\delta_H$  3,34. No espectro de HMBC (Apêndice R6) o sinal em  $\delta_H$  3,34 mostrou correlações com os átomos de carbonos em  $\delta_C$  23,8 e 68,9 e com o sinal das metilas em  $\delta_H$  50,4 ppm, indicando a presença de um grupo amino tetra substituído *N,N*-dimetil ligado a uma cadeia longa saturada (Figura 75, p. 109). Já o sinal em  $\delta_H$  4,53 mostrou correlações com os sinais atribuídos ao anel benzênico monossustituído ( $\delta_H$  7,57) e com os sinais de metila do sistema *N,N*-dimetil (Figura 75).

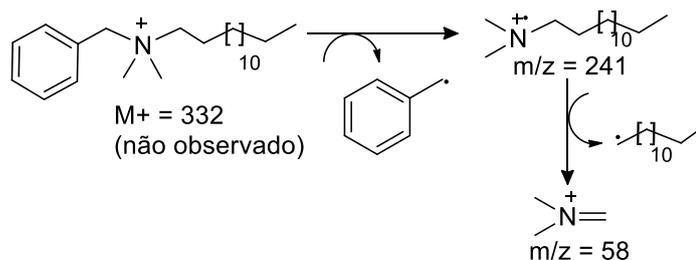
Figura 75. Principais acoplamentos (—) e correlações (↷) observados para DM-09 nos espectros COSY e HMBC



Fonte: Dados do autor

A massa molecular da cadeia longa foi determinada através da análise do espectro de massas obtido por CG EM (Apêndice R7), onde se observou o pico em  $m/z$  241 u.m.a., correspondente à uma cadeia de 14 átomos de carbono de um sistema *N,N*-dimetil-tetradecano-1-amino, justificado pela perda do radical benzila (91 u.m.a.). Além deste, foi observado o pico em  $m/z = 58$  u.m.a., pico base, correspondente à unidade *N*-metil-*N*-metilenometanamina, como mostrado na figura abaixo.

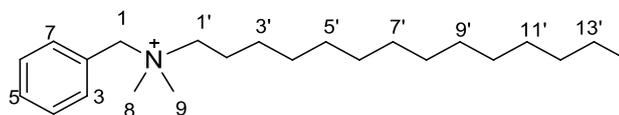
Figura 76. Principais fragmentos observados no espectro de massas



Fonte: Dados do autor

Pesquisas realizadas na literatura mostraram que o composto em questão se trata de uma amina quaternária, relatado como sendo de origem sintética, comercialmente produzido na forma de um sal de cloreto de alquil dimetil benzil amônio ou cloreto de benzalcônio (Figura 77), podendo ter cadeias contendo de 8-16 átomos de carbono.

Figura 77. Representação estrutural de DM-09



Fonte: Dados do autor

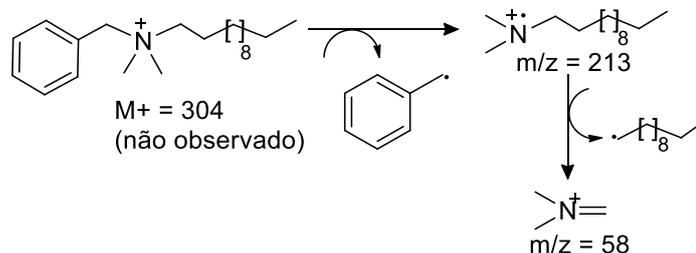
#### 4.5.2.1.2. Determinação estrutural de DM-10

O composto denominado DM-10, isolado na forma de uma resina de coloração amarela, apresentou rotação específica de  $[\alpha]_D^{21} + 56,30^\circ$  (c. 0,1 MeOH) e absorção do espectro de ultravioleta DAD-(UV<sub>λmax</sub>) 208 nm (Apêndice J1-j).

Os espectros de RMN uni e bidimensionais mostraram-se idênticas ao do composto DM-10, nos levando a propor que a diferença entre estes compostos possa estar associada ao tamanho da cadeia de hidrocarboneto ligada ao grupo *N,N*-dimetil. Isto foi confirmado através do espectro de massas obtido por CG EM-IE (Apêndice

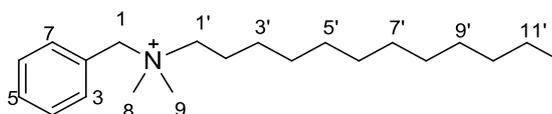
S6), onde se observou o pico correspondente à uma cadeia com 12 átomos de carbono em um sistema *N,N*-dimetil-dodecano-1-amino em  $m/z$  213 u.m.a.

Figura 78. Principais fragmentos observados no espectro de massas



Fonte: Dados do autor

Figura 79. Representação estrutural para DM-10



Fonte: Dados do autor

Os compostos DM-09 e DM-10, conhecidos como cloretos de benzalcônio, são surfactantes catiônicos e possuem ação antimicrobiana, sendo largamente utilizados em produtos de limpeza e higiene pessoal, além de formulações farmacêuticas (Chang *et al.*, 2015). Os relatos de obtenção destes compostos a partir de fontes naturais são geralmente associados ao descarte no meio ambiente de uma grande quantidade de produtos contendo estes compostos em sua formulação, sendo facilmente incorporados no tecido celular dos organismos terrestres e marinhos (Russo *et al.*, 2018). Em 2016, o FDA (Food and Drug Administration) anunciou a proibição da utilização de uma série de derivados dos cloretos de benzalcônio na formulação de produtos de higiene pessoal, como os antibacterianos, pois eles carecem de estudos complementares quanto aos riscos à saúde humana.

Tabela 21. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para DM-09 e DM-10 (CD<sub>3</sub>OD)

	DM-09 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz)		DM-10 (CD <sub>3</sub> OD, 300 MHz)		HMBC	
	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J em Hz)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
<b>1</b>	129,0	-	129,0	-	H-1	-
<b>2</b>	134,2	7,57 (m)	134,2	7,56 (m)	-	H-1
<b>3</b>	130,4	7,57 (m)	130,4	7,56 (m)	-	-
<b>4</b>	132,0	7,57 (m)	132,0	7,56 (m)	-	-
<b>5</b>	130,4	7,57 (m)	130,4	7,56 (m)	-	-
<b>6</b>	134,2	7,57 (m)	134,2	7,56 (m)	-	H-1
<b>7</b>	68,9	4,53 (s)	68,9	4,52 (s)	H-8/9	H-1'; H-3/7
<b>8</b>	50,4	3,02 (s)	50,2	3,02 (s)	-	H-1/1'; H-9
<b>9</b>	50,4	3,02 (s)	50,2	3,02 (s)	-	H-1/1'; H-8
<b>1'</b>	65,9	3,34 (m)	65,9	3,33(m)	-	H-1
<b>2'</b>	23,8	1,88 (sl)	23,8	1,88 (sl)	H-1'	-
<b>3'</b>	31 – 27	1,39 (sl)	31 – 27	1,39 (sl)	-	-
<b>4'-10'</b>	31 – 27	1,29 (s)	31 – 27	1,29 (s)	-	-
<b>11'</b>	33,1	1,39 (s)	33,1	1,39 (s)	-	-
<b>12'</b>	23,7	1,88 (sl)	23,7	1,88 (sl)	-	-
<b>14'</b>	14,5	0,91 (t, J = 6,6)	14,5	0,92 (t, J = 6,6)	-	--

Fonte: Próprio autor

#### 4.5.2.1.3. Determinação estrutural de DM-11

DM-11 foi isolado na forma de uma resina incolor, apresentando rotação específica de  $[\alpha]_D^{20} + 65,76$  (c. 0,1 MeOH) e absorção no espectro de ultravioleta em DAD-(UV $_{\lambda_{\text{max}}}$ ) 199 nm (Apêndice J1-k).

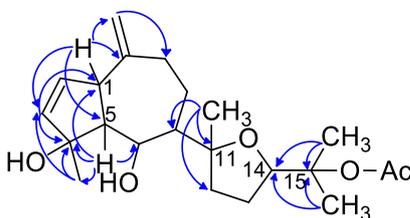
A determinação estrutural de DM-11 foi realizada através da análise comparativa de seus espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Apêndice T1-T2) e comparação com dados da literatura para compostos previamente relatados e isolados neste trabalho. Os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  4,71 (s) e 4,64 (s) para hidrogênios metilidênicos;  $\delta_{\text{H}}$  4,41

(dd,  $J = 9,0; 3,2$ ) para hidrogênio oximetínico, e 2,97 (d,  $J = 9,0$ ) e 2,25 (t,  $J = 9,0$ ) são característicos para anéis bicíclicos do tipo perhidroazulenoide em diterpenos de esqueleto guaiano.

A análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  BB ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) (Apêndice T2) e HSQC (Apêndice T3) apresentaram 22 linhas espectrais, condizente com um diterpeno acetilado. Os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  134,9 e 133,9 para carbonos olefínicos hidrogenados;  $\delta_{\text{C}}$  108,7 para o carbono metilidênico, além dos sinais para carbonos ligados a oxigênio em  $\delta_{\text{C}}$  97,0; 87,1; 83,6; 82,3 e 68,9 corroboram com a proposta de um diterpeno guaiano prenilado.

O anel bicíclico perhidroazulenoide foi confirmado através das correlações observadas entre os sinais dos hidrogênios metínicos em  $\delta_{\text{H}}$  2,97 (d,  $J = 9,0$ ; H-1) com os carbonos em C-3; C-5; C-10 e C18, e do sinal em  $\delta_{\text{H}}$  2,25 (t,  $J = 9,0$ ; H-5) com os carbonos em C-1; C-4, C-6 e C-17 no espectro de HMBC (Apêndice T4). A dupla ligação foi posicionada entre os carbonos C-2 e C-3 devido às correlações dos hidrogênios olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,70 (dd,  $J = 5,8; 1,8$ ; H-2) e 5,84 (dd,  $J = 5,8; 1,8$ ; H-3) com os carbonos do anel de cinco membros C-1 a C-5, e com o carbono oxigenado em  $\delta_{\text{C}}$  97,0 (C-4). Por fim, as correlações observadas para as metilas em  $\delta_{\text{H}}$  1,51 (s, 3H-16); 1,40 (s, 3H-20) e 1,31 (s, 3H-19) com os carbonos oximetínicos C-11, C14 e C-15, sugerem uma ciclização da cadeia prenilada, formando um éter cíclico do tipo furano, substituído por um grupo metila em C-11 e um grupo acetila ligado ao carbono C-15 (Figura 80).

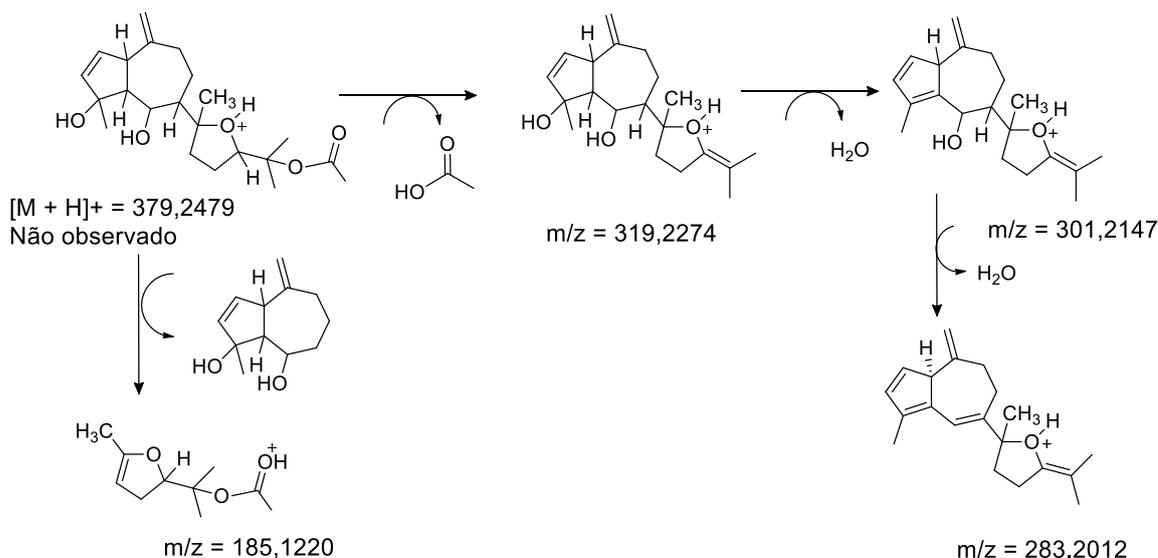
Figura 80. Principais correlações observadas para DM-11 no espectro de HMBC



Fonte: Dados do autor

Embora o espectro de massas de alta resolução, obtido por *eletrospray* (EMAR-ESI) no modo positivo (Apêndice T5), não tenha apresentado o pico referente ao íon molecular, este mostrou fragmentos correspondentes a perda de uma unidade de ácido acético, resultando no íon  $m/z = 319,2274$  u.m.a., seguido da perda de duas unidades de água  $m/z = 301,2147$  e  $283,2012$  u.m.a., além do pico referente a unidade prenilada ( $m/z = 185,1220$  u.m.a) (Figura 81), em acordo com a estrutura proposta.

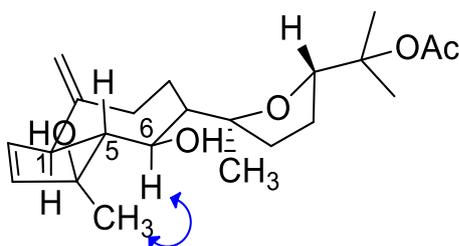
Figura 81. Principais fragmentos observados no espectro de massas (EMAR-ESI+) para DM-11



Fonte: Dados do autor

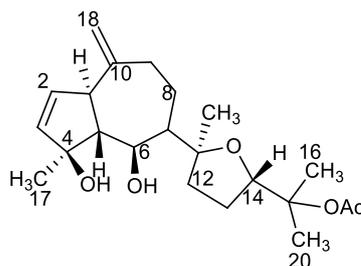
Pesquisas realizadas na literatura mostraram que existe o diterpeno guaiano furânico dictyol H, de estrutura semelhante a DM-11. Contudo a posição da dupla ligação no anel de cinco membros entre C-3 e C-4, fazendo com que este composto seja inédito. Sua estereoquímica relativa foi atribuída baseado nos acoplamentos dipolares, no espectro de NOESY (Apêndice T6), entre os hidrogênios 3H-17 com H-6. A fusão *trans* para o sistema de anéis foi estabelecida através das constantes de acoplamento para H-5 (t,  $J = 9,0$ ) mantendo uma relação *trans* com H-1 (d,  $J = 9,0$ ) e pseudo-axial com o hidrogênio H-6 (dd,  $J = 9,0; 3,5$ ). Esse tipo de conformação é comumente observado para diterpeno com anel perhidroazulenoide. A estereoquímica dos demais centros foi atribuída em comparação com os dados de RMN de seu análogo dictyol H e DM-11 foi, por tanto, nomeado como dictyol O (Chen *et al.*, 2018).

Figura 82. Estereoquímica relativa sugerida para DM-11



Fonte: Dados do autor

Figura 83. Representação estrutural para DM-11



Fonte: Dados do autor

Tabela 22. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DM-11 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)

	HSQC		HMBC		DM-01 ( $\text{CDCl}_3$ , 500)	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)
<b>1</b>	50,0	2,97 (d, $J = 9,0$ )	H-2; H-5	H-3; H-18	46,0	2,62 (m)
<b>2</b>	133,9	5,70 (dd, $J = 5,8$ )	H-3	-	34,1	2,48; 2,22 (m)
<b>3</b>	134,9	5,84 (dd, $J = 5,8$ )	H-2	H-1	123,7	5,32 (sl)
<b>4</b>	97,0	-	H-3; H-5	-	142,1	-
<b>5</b>	60,3	2,25 (t, $J = 9,0$ )	H-1	H-2; H-3	59,1	2,58 (m)
<b>6</b>	68,9	4,41 (dd, $J = 9,0$ ; 3,2)	H-5	-	74,7	3,89 (d, $J = 13,5$ )
<b>7</b>	51,7	1,77 (m)	-	H-19	46,0	1,59 (m)
<b>8</b>	23,0	1,75 (m)	-	-	23,2	1,57-1,52 (m)
<b>9</b>	40,2	2,62 (m); 2,05 (m)	-	H-10; H-18	40,3	2,61; 2,19 (m)
<b>10</b>	152,3	-	H-1	H-5	152,3	-
<b>11</b>	87,1	-	H-19	-	37,6	1,95 (m)
<b>12</b>	26,1	1,98 (m)	-	H-19	76,6	4,92 (m)
<b>12'</b>	-	-			172,0	-
<b>12''</b>					21,3	2,05 (s)
<b>13</b>	35,5	2,05 (m); 1,78 (m)	-	-	27,7	2,27 (m)
<b>14</b>	83,6	3,86 (t, $J = 7,3$ )	-	H-16; H-20	119,9	5,09 (t, $J = 7,2$ )
<b>15</b>	82,3	-	H-16; 20	-	134,4	-
<b>15'</b>	170,5	-	-	-	-	-
<b>15''</b>	22,4	1,95 (s)	-	-	-	-
<b>16</b>	22,7	1,51 (s)	-	-	18,0	1,62 (s)
<b>17</b>	19,0	1,40 (s)	-	H-5	16,0	1,82 (sl)
<b>18</b>	108,7	4,71 (s); 4,64 (s)	-	H-1	107,4	4,75 (sl)
<b>19</b>	24,6	1,31 (s)	-	-	12,6	1,02 (d, $J = 6,8$ )
<b>20</b>	22,6	1,45 (s)	-	-	25,8	1,69 (s)

Fonte: Dados do autor

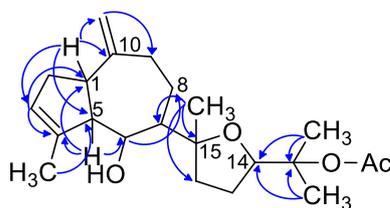
#### 4.5.2.1.4. Determinação estrutural de DM-12

O composto intitulado DM-12 foi obtido na forma de uma resina de coloração amarelada, apresentando rotação específica  $[\alpha]_D^{20} + 52,02$  (c. 0,1 MeOH) e absorção no espectro de ultravioleta DAD-( $UV_{\lambda_{max}}$ ) 199 nm (Apêndice J1-I).

A caracterização estrutural de DM-12 foi realizada através da interpretação dos dados obtidos nos espectros de RMN de  $^1H$ ,  $^{13}C$  e comparação com dados prévios relatados (CHEN *et al.*, 2018). No espectro de RMN  $^1H$  (Apêndice U1) observou-se o padrão de distribuição dos sinais compatíveis com diterpenos de esqueleto guaiano prenilado, com destaque para os sinais de hidrogênios olefínicos em  $\delta_H$  2,65 (m, H-1); 2,36 (t,  $J = 8,5$ ; H-5), e 4,74 (s, H-14) e 4,02 (m, H-6) dos grupos oximetínicos.

Devido a semelhança dos dados de RMN  $^{13}C$  BB (Apêndice U2) entre DM-12 e DM-11, seus deslocamentos químicos foram comparados com os do análogo dictyol H, previamente isolado da alga parda *D. dentata*, por Alargado e Gerwick (1985). Para DM-11 e dictyol H não se observou variações significativas nos deslocamentos químicos, mesmo que os dados tenham sido obtidos em solventes diferentes. A confirmação final da estrutura foi através do espectro de HMBC (Apêndice U3) pelas correlações para as correlações das metilas em  $\delta_H$  1,45 (s, H-16); 1,29 (s, H-19) e 1,51 (s, H-20) com os carbonos do anel furânico C-11, C-12, C-13 e C-14 e com o carbono oxigenado não-hidrogenado C-15, além das correlações para o hidrogênio oximetínico em  $\delta_H$  4,02 (dd,  $J = 8,5$ ; 3,5) com os carbonos C-4 e C-8, como pode ser verificado na figura 84.

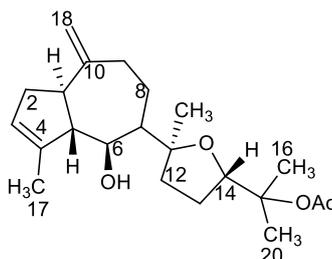
Figura 84. Principais correlações para DM-12 no espectro de HMBC



Fonte: Dados do autor

Pesquisas mostraram que dictyol H foi submetido a vários testes de atividade antimicrobianos e antitumorais, não mostrando efeito significativo em ambos os testes (Cheng *et al.*, 2018).

Figura 85. Representação estrutural para DM-12



Fonte: Dados do autor

Tabela 23. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para DM-12 ( $\text{CDCl}_3$ )

	HSQC		HMBC		*Literatura ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)	
	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	$\delta_C$	$\delta_H$ (J em Hz)
<b>1</b>	47,6	2,65 (m)		H-3 2H-18	46,0	2,56 (ddd, $J=$ 15;5;3)
<b>2</b>	34,8	2,56 (m)	H-1 H-3		33,9	2,15 (m)
<b>3</b>	124,9	5,32 (s)		3H-17	123,6	5,21 (sl)
<b>4</b>	143,0	-	3H-17	H-6	142,0	-
<b>5</b>	61,5	2,36 (t, $J= 8,5$ )		H-1; 3H-17 H-3	59,4	2,37 (t, $J = 7,0$ )
<b>6</b>	74,4	4,02 (dd, $J= 8,5; 3,5$ )		H-1	73,3	4,01 (dd, $J = 7,9;$ 2,7)
<b>7</b>	53,1	1,93 (m)		3H-17	50,1	1,81 (m)
<b>8</b>	23,4	1,85 (m)		H-6	22,1	1,81 (m)
<b>9</b>	42,0	2,59 (m)		2H-18	40,4	2,47 (m)
<b>10</b>	154,2	-	H-1 2H-18		152,1	-
<b>11</b>	88,3	-	3H-17		86,9	-
<b>12</b>	35,1	1,78 (s)		3H-17	35,0	2,00 (m);
<b>13</b>	27,9	1,87 (m)			25,9	1,88 (m)
<b>14</b>	83,6	3,90 (m)		3H-16 3H-20	83,5	3,55 (dd, $J = 7,5;$ 7,5)
<b>15</b>	84,5	-	3H-16 3H-20		82,1	-
<b>15'</b>	172,5	-	3H-18''		170,5	-
<b>15''</b>	22,9	1,91 (s)			22,5	1,81 (s)
<b>16</b>	22,8	1,45 (s)			22,7	1,56 (s)
<b>17</b>	16,4	1,79 (sl)			15,8	1,77 (s)
<b>18</b>	107,6	4,74 (s)		H-1	102,2	4,70 (s)
<b>19</b>	25,4	1,29 (s)			22,5	1,32 (s)
<b>20</b>	22,6	1,51 (s)			22,5	1,51 (s)

Fonte: Dados do autor \*Alarado; Gelwick, 1985.

#### 4.5.2.1.5. Determinação estrutural de DM-13

O composto DM-13, isolado a partir do extrato acetato de etila, como uma resina de coloração esverdeada, mostrou  $[\alpha]_D^{20}$  - 45,05 (c. 0,1 MeOH) e absorção no espectro de ultravioleta DAD-(MeOH  $\lambda_{\text{máx}}$ ) 199 nm (Apêndice J1-m).

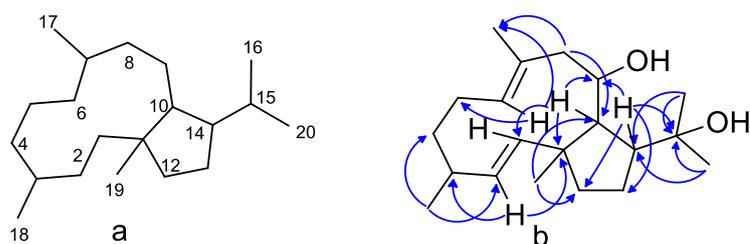
A fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$  (IDH = 4) foi deduzida pelo espectro de massas de alta resolução (ESI+) (Apêndice V5) através do cátion radicalar  $[\text{M}^{\bullet+}]$   $m/z$  306,2548 u.m.a. Foi observada a perda de duas unidades de água, justificada pelos picos com  $m/z$  288,2391 e  $m/z$  270,2295 u.m.a., conforme apresentado na Figura 87 (p. 119).

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (MeOD, 500 MHz) de DM-13 (Apêndice V1) mostrou sinais para três hidrogênios olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,24 (d,  $J= 16,0$  Hz), 5,12 (d,  $J= 16,0$  Hz) e 5,02 (t,  $J= 7,4$ Hz); um sinal para hidrogênio ligado a carbono oxigenado em  $\delta_{\text{H}}$  3,47 (dt,  $J= 10,7; 2,5$  Hz) e sinais para hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos (Tabela 24, p. 120). Os deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$  do composto DM-13 indica que o composto em destaque se trata do 18-hidroxi-dollabeladieno, um diterpeno de esqueleto dolabellano (Figura 86a, p. 118), comum no gênero *Dictyota* (Cheng *et al.*, 2014).

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  BB (MeOD, 125 MHz) de DM-13 (Apêndice V2) mostrou 20 linhas espectrais, corroborando com a presença de um diterpeno. Dentre os sinais observados destacaram-se os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  136,8; 135,9; 130,9 e 129,5 para carbonos olefínicos e os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  73,4 e 69,5 para carbonos oxigenados. A análise dos espectros de RMN APT (Apêndice V3) e HMQC (Apêndice V4) permitiu definir o padrão de hidrogenação dos carbonos como sendo, cinco carbonos metílicos, cinco metilênicos, sete metínicos e três carbonos não-hidrogenados, como pode ser visto na tabela 24 (p. 118).

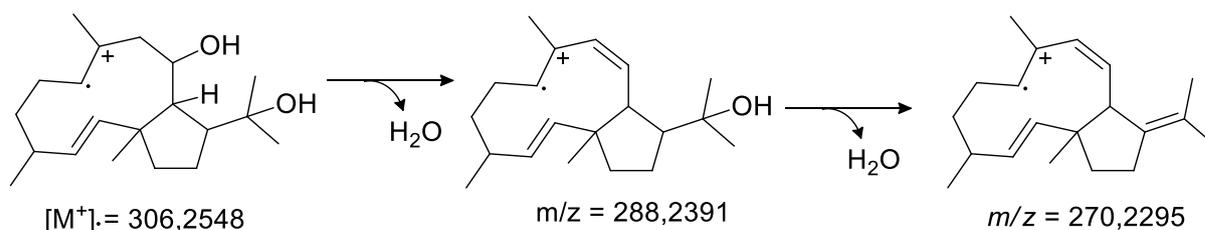
As correlações observadas no espectro de HMBC (Apêndice V6) apresentados na tabela 24 (p. 119) confirmaram a proposta estrutural da molécula (Figura 86, p. 118).

Figura 86. Representação estrutural do esqueleto dolabellano (a) e principais correlações no espectro 2D HMBC para DM-13 (b)



Fonte: Dados do autor

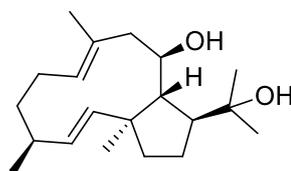
Figura 87. Fragmentação de massas observado no espectro de EMAR-ESI de DM-13



Fonte: Dados do autor

A estereoquímica relativa proposta para DM-13 foi realizada por comparação dos deslocamentos químicos, previamente relatados para o composto, cuja estrutura foi determinada via cristalografia de Raio-x (Ireland *et al.*, 1976).

Figura 88. Estrutura proposta de DM-13



Fonte: Dados do autor

DM-13 foi o único diterpeno de esqueleto dolabellano isolado pertencente ao grupo 2 da divisão proposta por Teixeira e Kelecom (1988). O primeiro relato de isolamento dessa classe se deu por Ireland (1976), a partir das glândulas digestivas do molusco *Dolabella californica*. Posteriormente foi verificado que este composto era proveniente do processo de alimentação do animal. Essa hipótese foi confirmada por Amico (1981) ao isolar a forma acetilada deste composto da alga *D. dichotoma*.

Tabela 24. Deslocamentos químicos de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC de DM-13 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)

	DM-13 ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz)		HMBC	
	$\delta_C$	$\delta_H$	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
1	136,8	5,12 (d, $J= 16,0$ )	-	H-10
2	135,9	5,24 (d, $J= 16,0$ )	-	H-18
3	39,6	2,09 (m)	H-2	-
4	36,9	1,57 (m); 1,42 (m)	-	H-18
5	28,1	2,15 (m)	H-6	-
6	130,9	5,02 (t, $J= 7,4$ )	-	-
7	129,5	-	-	-
8	50,7	2,27(dd, $J= 12,2; 12,1$ ); 2,12 (m)	-	-
9	69,5	3,47 (dt, $J= 10,7; 2,5$ )	H-10	H-11
10	58,4	1,74 (dd, $J= 10,9; 2,9$ )	H-14	H-8; H-19
11	47,6	-	H-10	H-2
12	40,1	1,42 (m)		H-14; H-19
13	26,5	1,88 (m); 1,31 (m)	H-14	-
14	49,7	2,54 (td, $J= 11,0; 6,0$ )	-	H-16; H-20
15	73,4	-	H-14; H-16; H-20	-
16	31,4	1,22 (s)	-	H-20
17	18,2	1,61 (s)	-	H-6; H-8
18	21,8	0,95 (d, $J= 6,9$ )	-	H-2
19	19,8	0,96 (s)	-	-
20	22,9	1,21 (s)	-	H-16

Fonte: Dados do autor

### **4.5.3. Resultados dos testes farmacológicos**

Para a realização dos ensaios de atividade apresentados neste trabalho foram utilizados os compostos que apresentaram quantidade de amostra de 5 mg.

#### *4.5.3.1. Ensaio antimicrobiano*

Os compostos DM-01 a DM-08 foram avaliados frente a 2 cepas de bactérias, sendo uma Gram-positiva e uma Gram negativa, *S. aureus* e *E. coli*, respectivamente. Os compostos foram testados na concentração única de 200 µg/mL, mas apenas os compostos DM-06 e DM-07 apresentaram inibição do crescimento bacteriano contra a cepa *S. aureus*. DM-06 apresentou CIM igual 100 µg/mL, sendo considerado pouco ativo, já DM-07 não teve sua CIM calculada, pois a molécula aglutinou no processo de diluição seriada, não permitindo sua análise.

#### *4.5.3.2. Ensaio de atividade citotóxico (HCT-116)*

Os compostos DM-01 a DM-08 foram avaliados quanto ao seu potencial citotóxico contra as linhagens de células cancerígenas HCT-116 (câncer de próstata), contudo, devido a inúmeras inconsistências nas repetições dos testes, os resultados obtidos não foram considerados confiáveis, não sendo mensurados no trabalho.

#### *4.5.3.3. Ensaio de viabilidade celular*

Todos os compostos obtidos das algas pardas *D. menstrualis* e *D. mertensii*, com exceção de DM-03 e DM-13, foram avaliados nas linhagens de macrófagos RAW-264.7 para determinar a concentração mínima na qual os compostos não afetam o desenvolvimento das células. A concentração que não possui toxicidade nas células RAW-264.7 estimulados com 1 µg/mL de LPS pode ser vista na tabela 25 (p. 121).

Tabela 25. Citotoxicidade dos compostos em linhagens de macrófagos RAW- 264.7 estimuladas com LPS (1 µg/ml)

<i>Compostos</i>	$CI_{50}^a \pm SD (\mu M)$
<i>DM-01</i>	2,12 ± 0,32
<i>DM-02</i>	2,53 ± 0,40
<i>DM-04</i>	1,75 ± 0,24
<i>DM-05</i>	2,12 ± 0,32
<i>DM-06</i>	1,82 ± 0,26
<i>DM-07</i>	1,82 ± 0,26
<i>DM-08</i>	1,12 ± 0,04
<i>DM-09</i>	24,8 ± 2,2
<i>DM-10</i>	26,9 ± 2,0
<i>DM-11</i>	106,2 ± 2,1
<i>DM-12</i>	97,1 ± 2,8

Valores de  $^aCI_{50}$  foram definidos pelas concentrações que resultaram em redução de 50% da viabilidade celular.

Fonte: Dados do autor

Todos os compostos obtidos de *D. menstrualis* (DM-01 a DM-08) apresentaram  $CI_{50} > 1 \mu M$ , enquanto os compostos de *D. mertensii* (DM-09 a DM-12) apresentaram  $CI_{50} > 24 \mu M$ . O valor de  $CI_{50}$  para cada amostra é considerada a concentração a partir da qual o composto apresenta toxicidade para as células RAW-264.7, dessa forma, concentrações inferiores a esses valores são consideradas seguras para serem utilizadas em ensaios subsequentes.

#### 4.5.3.4. Teste de inibição da produção do ON

Com base nos resultados encontrados no teste de viabilidade celular, foi possível determinar o perfil citotóxico dos compostos, bem como, estabelecer as concentrações viáveis para a quantificação de ON. Foi avaliado a inibição da produção de ON, de forma indireta, através da detecção de nitrito ( $NO_2^-$ ). Óxido nítrico é um importante mediador inflamatório produzido pela ON sintase induzida (iNOS). Níveis elevados de ON estão presentes em diversas doenças inflamatórias crônicas e agudas, artrite, úlcera gástrica e doenças autoimunes (Guzik *et al.*, 2003). Os compostos DM-01 a DM-08, com exceção de DM-03, foram testados em

concentrações variando de 0,07 a 1,5  $\mu\text{M}$ , enquanto DM-09 e DM-10 em concentrações variando 3,0 a 50,0  $\mu\text{M}$ . Já os compostos DM-11 a DM-12 em concentrações de 0,7 a 12,0  $\mu\text{M}$ . Nessas concentrações foi avaliado o efeito inibidor da produção de ON estimulada por LPS em macrófagos RAW-264.7, como pode ser visto na figura 89 (p. 123). Todos os compostos apresentaram bons resultados e tiveram seus  $\text{CI}_{50}$  calculados, como mostrado na tabela 26.

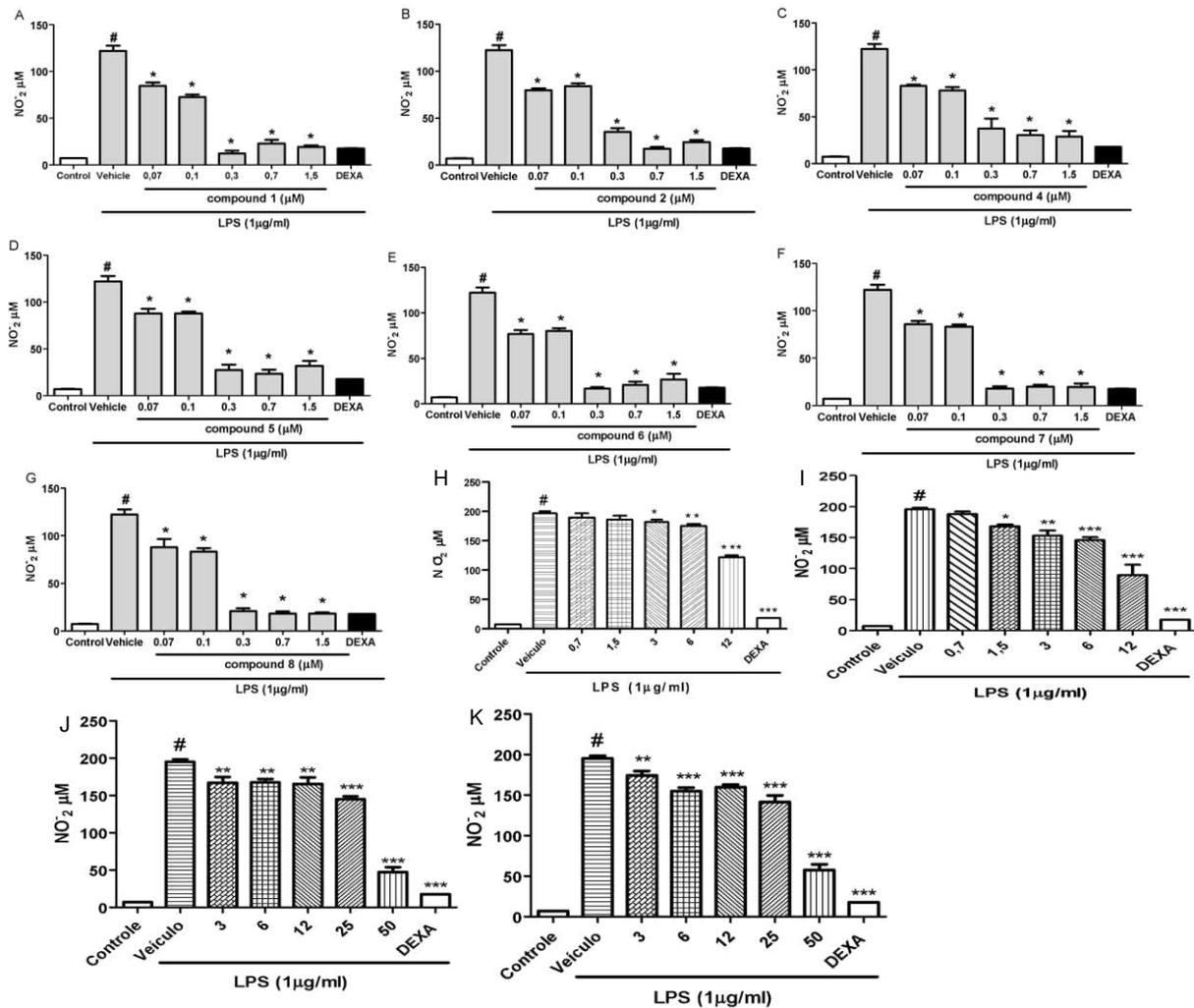
Tabela 26. Efeito inibitório dos compostos puros na produção do ON sobre macrófagos RAW-264.7 estimuladas com LPS

<i>Compostos</i>	<i><math>\text{IC}_{50}^a \pm \text{SD} (\mu\text{M})</math></i>
<i>DM-01</i>	$0,16 \pm 0,05$
<i>DM-02</i>	$0,23 \pm 0,03$
<i>DM-04</i>	$0,19 \pm 0,08$
<i>DM-05</i>	$0,21 \pm 0,46$
<i>DM-06</i>	$0,16 \pm 7,67$
<i>DM-07</i>	$0,12 \pm 3,19$
<i>DM-08</i>	$0,16 \pm 0,07$
<i>Dexametasona</i>	$1,53 \pm 0,03$

Valores de  $^a\text{IC}_{50}$  foram definidos pelas concentrações que resultaram em redução de 50% de óxido nítrico (ON). Os valores representam a média de três experimentos independentes. Dexametasona foi utilizado como controle positivo.

Fonte: Dados do autor

Figura 89. Atividade inibitória na produção de ON em células RAW 264.7 estimuladas com LPS



Legenda: A=DM-01; B= DM-02; C=DM-04; D=DM-05; E=DM-06; F=DM-07; G=DM-08; H=DM-11; I=DM-12; J=DM-09; K=DM-10; DEXA=Dexametasona; Controle= Dexametasona 4 μM; Veículo= DMSO 0,1%. Os níveis de ON no meio foram medidos pelo método de Griess. Valores representam a média ±SD de três experimentos independentes. #p < 0,05 versus controle. \*p < 0,05 versus grupo estimulado com LPS.

Fonte: Dados do autor

Todos os compostos, nas concentrações testadas (Figura 89), foram capazes de inibir a produção de ON estimulada por LPS em macrófagos RAW264.7. Os valores de IC<sub>50</sub> desses compostos variaram entre 1,75 – 2,53 μM, valores muito próximos ao encontrado para a dexametasona (1,53 ± 0,03 μM), droga anti-inflamatória padrão. Tais resultados demonstram que os compostos obtidos de *D. menstrualis* apresentam potente atividade anti-inflamatória, em concentrações que

não mostraram citotoxicidade, conferindo assim vantagens em relação à concentração-efeito e a segurança. Os compostos DM-09, DM-10, DM-11, DM-12 apresentaram redução da produção do ON estimulada por LPS em macrófagos RAW-264.7 a partir de concentrações mais elevadas, 12  $\mu\text{M}$  para os diterpenos e 50  $\mu\text{M}$  para os cloretos de benzalcônio. Embora esses valores sejam bem superiores aos observados para a droga de referência, a dexametasona ( $1,53 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ), esses compostos exibem atividade anti-inflamatória, em concentrações que não mostraram citotoxicidade.

#### **4.6. Conclusões do capítulo**

As algas pardas pertencentes ao gênero *Dictyota*, se mostraram como profícuas fontes de metabólitos bioativos, devido a abundância de compostos com potencial terapêutico. Neste trabalho obteve-se onze diterpenos, dos quais, quatro obtidos pela primeira vez. O isolamento de diterpenos corrobora com estudos químicos prévios, entretanto, o isolamento dos cloretos de benzalcônio é inédito no gênero. Conforme levantamento, estes compostos são de origem sintética e integram a formulação de materiais de higiene, como detergentes e desinfetantes. Isto nos levou a sugerir que a alga pode estar bioadsorvendo estes compostos como consequência de um ambiente poluído.

Os compostos obtidos de ambas as espécies foram considerados potenciais candidatos a testes futuros para avaliar o efeito anti-inflamatório, uma vez que forneceram fortes indicativos dessa propriedade nos testes de inibição do ON.

O efeito antimicrobiano dos compostos isolados, ainda que não tenham sido ativos, foram considerados importantes.

O efeito citotóxico contra as células de câncer HCT-116 não pode ser avaliado, contudo, contra a linhagem de macrófagos RAW-264.7 estimulados com LPS, apresentaram citotoxicidade, o que pode indicar seletividade contra certas linhagens de células tumorais.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Métodos cromatográficos

#### 5.1.1 Cromatografia de adsorção

Nas separações por cromatografia em coluna foram utilizados gel de sílica da Merck e Vetec (*mesh* 230-400  $\mu\text{m}$ ). As cromatografias foram realizadas de duas formas: em coluna aberta ou a vácuo “cromatografia do tipo flash”. Para as cromatografias a vácuo, foi empregada uma bomba de ar comprimido modelo Inalar Compact Ind. de aparelhos médicos Ltda em Funil de *Buchner* com placa porosa sinterizada. Os comprimentos e diâmetros das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostras a serem analisadas. Os adsorventes utilizados foram n-hexano, AcOEt e MeOH PA (Synth, Vetec e/ou Merck), puros ou em misturas binárias em ordem crescente de polaridade.

#### 5.1.2 Cromatografia de adsorção em camada delgada

Para as cromatografias em camada delgada (CCD) utilizou-se placas de alumínio (cromatofolhas), com gel de sílica 60, 5-40  $\mu\text{m}$ , com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm (F254), Merck. As revelações das substâncias, nas placas cromatográficas, foram realizadas por exposição em lâmpada de irradiação modelo CN-15LM da Vilber Lourmat com dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) ou pela imersão nos reagentes descritos abaixo.

- Solução de Vanilina de uso geral, requer aquecimento de 100-120 °C - Spots com variedades de cores em fundo levemente amarelado - prepara-se dissolvendo 0,5 g da vanilina ( $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$ ) em EtOH e ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) ou dissolvendo 15,0 g de vanilina em 250,0 mL de etanol a 0 °C, seguida da adição lentamente de 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado.

- Reagente de Ehrlich detecta compostos orgânicos nitrogenados, especialmente aminas e indóis, geralmente não é necessário aquecimento, mas se necessário, aquecer de 60-80 °C, prepara-se dissolvendo 10,0 g 4-

dimetilaminobenzaldeído (C<sub>9</sub>H<sub>11</sub>NO) em 10,0 mL de HCl concentrado e 90,0 mL de EtOH.

- Reagente Sulfato cérico de uso geral, principalmente derivados terpênicos com coloração violeta a azul, com aquecimento brando, com temperaturas inferiores a 80 °C.

### 5.1.3 Cromatografias de exclusão

Os fracionamentos por cromatografia por exclusão (peneira molecular) foram efetuados em gel formado pelo derivado hidroxipropil dextrana (Sephadex LH-20) da *Pharmacia Fine Chemicals*, utilizando-se metanol puro e metanol/CHCl<sub>2</sub>/Hexano 1:1:1 como fase móvel.

### 5.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em aparelho da marca Shimadzu, modelo UFLC (Ultra Fast Liquid Chromatograph), equipado com detector UV-vis com arranjo de diodo (SPD-M20A) e um sistema de bomba ternário. Os solventes utilizados apresentaram grau de pureza CLAE (MeOH e ACN da Tedia® e H<sub>2</sub>O-Milli-Q, levemente acidificada com TFA), os quais, foram adequadamente filtrados através de membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Millipore). As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e posteriormente filtradas em membranas de nylon com poros de 0,45 µm (Whatman).

#### 5.1.4.1 Métodos de análise por CLAE

- **Método 1:** coluna analítica C18 (4.6 x 250 mm, 5µm) Gemini-Phenomenex®, com fase móvel isocrática composta pelo solvente B (ACN) em 30 min, mantida em forno termostático a 35 °C, usando canal de monitoramento DAD na faixa de 210-400 nm, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e concentração das amostras de ~ 1,0 mg/mL.

- **Método 2:** coluna analítica C18 (4,6 x 250 mm, 5 $\mu$ m) Gemini-Phenomenex®, com fase móvel composta pelo gradiente H<sub>2</sub>O (0,1% TFA) / MeOH 75-100% por 25 minutos, seguido de 10 minutos com metanol puro, com fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 1,0  $\mu$ L, forno termostático a 35 °C, DAD (210-400 nm) e concentração das amostras ~ 1,0 mg/mL.
- **Método 3:** coluna analítica C6-Fenil (4,6 x 250 mm, 5 $\mu$ m) Gemini-Phenomenex®, com fase móvel composta pelos solventes A (H<sub>2</sub>O 0,1% TFA) e B (CH<sub>3</sub>OH) nas condições de análise de 85-100% de B em 5 min + 20 min de B puro, totalizando 25 min de corrida, com temperatura de forno de 35 °C, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L e concentração das amostras de 1,0 mg/mL.
- **Método 4:** coluna analítica C6-Fenil (4,6 x 250 mm, 5 $\mu$ m) Gemini-Phenomenex®, com fase móvel composta pelos solventes A (H<sub>2</sub>O 0,1% TFA) e B (CH<sub>3</sub>OH) nas condições de análise de 55-100% de B em 15 min + 10 min de B puro, totalizando 25 min de corrida, com temperatura de forno de 35 °C, fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20  $\mu$ L e concentração das amostras de 1,0 mg/mL.
- **Método 5:** coluna analítica C18 sob as mesmas condições de análise descritas no método 2

#### 5.1.4.2 Métodos de isolamento por CLAE

- **Método 1:** coluna semi-preparativa C18 (10 x 250 mm, 5 $\mu$ m) Gemini-Phenomenex®, com fase móvel isocrática composta pelo solvente B (ACN) em 20 min de corrida, mantida em forno termostático a 35 °C, usando canal de monitoramento DAD na faixa de 210-400 nm, fluxo de 3,0 mL/min, volume de injeção de 150  $\mu$ L e concentração das amostras de ~ 20,0 mg/mL.
- **Método 2:** colunas semipreparativa C18 (4,6 x 250 mm, 5 $\mu$ m) Gemini-Phenomenex®, com fase móvel composta pelo gradiente H<sub>2</sub>O (0,1% TFA) / MeOH 75-100% por 25 minutos, seguido de 5 minutos com metanol puro, com fluxo de 2,5 mL/min, volume de injeção de 150,0  $\mu$ L,

forno termostático a 35 °C, DAD (210-400 nm) e concentração das amostras ~ 20,0 mg/mL.

- **Método 3:** coluna semi-preparativa C6-Fenil (10 x 250 mm, 5µm) Gemini-Phenomenex®, com fase móvel composta pelos solvente A (H<sub>2</sub>O 0,1% TFA) e B (CH<sub>3</sub>OH) nas condições de coleta de 85-100% de B em 5 min + 20 min de B puro, totalizando 25 min de corrida, mantida em forno termostático a 35 °C, usando canal de monitoramento DAD na faixa de 210-400 nm, fluxo de 3,0 mL/min, volume de injeção de 150 µL e concentração das amostras de ~ 20,0 mg/mL.
- **Método 4:** coluna semi-preparativa C6-Fenil (10 x 250 mm, 5µm) Gemini-Phenomenex®, com fase móvel composta pelos solvente A (H<sub>2</sub>O 0,1% TFA) e B (CH<sub>3</sub>OH) nas condições de coleta de 55-100% de B em 15 min + 10 min de B puro, totalizando 25 min de corrida, mantida em forno termostático a 35 °C, usando canal de monitoramento DAD na faixa de 210-400 nm, fluxo de 3,0 mL/min, volume de injeção de 150 µL e concentração das amostras de ~ 20,0 mg/mL.
- **Método 5:** coluna semi-preparativa C18 sob as mesmas condições de análise descritas no método 2

## 5.2 Métodos físicos

### 5.2.1 Ponto de fusão

O ponto de fusão das substâncias isoladas foi obtido em equipamento da Marconi com determinação digital com rampa aquecedora R480D. As determinações foram realizadas a uma velocidade de aquecimento de 3 °C min e não foram corrigidas.

### 5.2.2 Rotação óptica

As rotações ópticas foram medidas num polarímetro digital Perkin-Elmer Jasco 2000 a temperatura entre 20 °C e 22 °C em cuba de 1,0 dm/1,0 mL com detecção dos valores de rotação na linha espectral do sódio (589 nm).

### **5.2.3 Espectrometria de massa (EMAR)**

As análises de espectrometria de massas de alta resolução foram realizadas em um Acquity UPLC (BEH C18 column, 1,7  $\mu\text{m}$ , 2,1 mm x 100 mm) acoplado a um analisador de massas Xevo QToF (Waters, Milford, MA, USA) pertencente ao Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical, equipado com fonte de ionização por electrospray (ESI) ou ionização química à pressão atmosférica (APCI) operando nos modos positivo e negativo.

### **5.2.4 Espectrometria de massa (CG-EM)**

Os espectros de massa de baixa resolução foram registrados num espectrômetro (CG-EM Shimadzu/QP2010, utilizando coluna capilar RTX 30 m x 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme e gás transportador hélio), através de impacto eletrônico a 70 eV, pertencente à Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará.

### **5.2.5 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN)**

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) e carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetros da Bruker modelo Avance DRX-300 ou DPX-500, operando na frequência de 300,13 e 499,60 MHz para  $^1\text{H}$ , 125,40 e 75,47 MHz para  $^{13}\text{C}$  e 202,2 MHz para  $^{31}\text{P}$ . Os espectrômetros são equipados com sonda BBI de 5 mm com bobinas de gradiente no eixo z ( $^1\text{H}$  90° de largura de pulso = 9,20 sec,  $^{13}\text{C}$  90° de largura de pulso = 14,25 sec). As análises foram realizadas a 298 K utilizando de 1,8 a 10,0 mg de cada composto em um volume ~ 0,5 mL por amostra. Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram; clorofórmio ( $\text{CDCl}_3$ ) e metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN  $^1\text{H}$  pelo sinal do hidrogênio pertencente a fração não-deuterada dos solventes; clorofórmio ( $\delta_{\text{H}}$ , 7,27) e metanol ( $\delta_{\text{H}}$ , 3,31). Para os espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  pelo pico de carbono-13 do solvente;

clorofórmio ( $\delta_c$ , 77,23) e metanol ( $\delta_c$ , 49,15). As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto), qu (quinteto) e m (multiplete).

### 5.3 Testes de atividade biológico

Os compostos obtidos a partir dos extratos hexânico e acetato de etila foram submetidos a testes de atividade *in vitro*. Foram realizados os ensaios antimicrobiano, antioxidante, citotóxico e potencial de inibição de liberação de ON (anti-inflamatório).

#### 5.3.1 Ensaio antimicrobiano

Os ensaios antimicrobianos foram realizados contra as cepas de bactérias Gram-positiva *S. aureus* ATCC 29213 e Gram-negativa *E. coli* ATCC 25922. As cepas foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC), tendo sido cultivadas em ágar Muller Hinton, mantidas em estufa por 24 h a  $35 \pm 2$  °C.

**Experimento resumido:** As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril, e posteriormente diluídas em caldo Mueller Hinton, sendo testadas inicialmente na maior concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$ , em duplicatas. As amostras que apresentaram inibição do crescimento bacteriano, foram testadas por meio de uma diluição seriada de razão 2 para determinação do valor da CIM (concentração inibitória mínima). Após 24 horas, as colônias isoladas foram coletadas com alça bacteriológica descartável e suspensas em solução salina estéril [NaCl 0,85% (p/v)], até que se obtivesse uma absorbância variando entre 0,08 a 0,1 sob um comprimento de onda de 625 nm, o que corresponde a 0,5 na escala de McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL). Em seguida, essa suspensão foi utilizada para a obtenção do inóculo bacteriano em Caldo Mueller Hinton com a concentração final de bactérias de  $5 \times 10^5$  UFC/mL. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de concentração única em caldo (em placa de 96 poços), no qual a atividade inibitória das substâncias foi determinada conforme normas preconizadas pela CLSI (2012). As bactérias foram expostas às substâncias diluídas no meio de cultura e DMSO (5%), com concentrações fixas

### 5.3.2 Avaliação do efeito citotóxico e viabilidade celular

Os extratos e compostos obtidos no trabalho foram avaliados quanto a inibição do crescimento em linhagens de células cancerígenas HCT-116 após 72h de incubação pelos ensaios do MTT e SRB e pela linhagem de macrófagos RAW-264.7 após 24h de incubação realizado pelo ensaio do SRB.

#### 5.3.2.1 Pelo método MTT

O ensaio do MTT é uma análise colorimétrica indireta que consiste na conversão do sal amarelo 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) em um precipitado de coloração roxa (formazan). A conversão do MTT em formazan ocorre apenas em células viáveis e metabolicamente ativas, através da ação da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias. Desta forma, a quantificação indireta da porcentagem de células vivas pode ser mensurada usando espectrofotômetro (Mosmann, 1983).

**Experimento resumido:** As células foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por um período de 72 horas com os extratos, frações ou substâncias puras, previamente diluídos a uma concentração estoque de 10,0 mg/mL em DMSO, tendo a doxorubicina controle positivo. Os testes foram realizados em dose única de 5,0 e 50,0 µg/mL e aquelas amostras que apresentaram inibição maior ou igual 75% do crescimento celular foram consideradas potencialmente ativas. Os valores da leitura de absorbância foram normalizados para o grupo branco com base em 0% e para o grupo de controle negativo como 100%. As análises foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 5.0.

#### 5.3.2.2 Pelo método SRB

A sulforrodamina B (SRB) é empregada para a avaliação da citotoxicidade e proliferação celular em ensaios em microplacas (LIN *et al.*, 1999). A SRB é um corante roxo que, em condições moderadamente ácidas, se liga a aminoácidos básicos da proteína celular, e se dissocia em condições básicas. A ligação da SRB é estequiométrica, e a quantidade de corante extraído de células pigmentadas é

diretamente proporcional à massa total de proteína e, portanto, correlacionada com o número de células (Papazisis *et al.*, 1997, Vichai; Kirtikara, 2006).

**Experimento resumido:** as células foram plaqueadas nas concentrações de  $3,0 \cdot 10^4$  e  $1,5 \cdot 10^5$ , incubadas overnight em estufa incubadora a 37 °C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. As amostras testadas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) e testadas quanto a viabilidade em células HCT-116 e RAW-264,7. Para a avaliação da proliferação foram utilizadas diluições seriadas em triplicatas de concentrações variando de 0,032 a 50 µg/ml. Em seguida, as células foram incubadas em volume final de 200 µL, permanecendo por 24h ou 72h em contato com o tratamento, em estufa incubadora a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Em seguida adicionou-se 60 µL da solução de SRB a 0,4%, e as placas foram mantidas em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 30 minutos. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro de placa (*Fisher Scientific*, modelo Multiskan FC) no comprimento de onda 570 nm.

### 5.3.3 Teste antioxidante (DPPH)

O radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) é considerado um radical livre estável, no entanto, falta um elétron em sua estrutura. Este radical é utilizado como ferramenta para estudo da ação de compostos sequestradores de radicais livres, e a técnica que utiliza esse radical é independente de qualquer atividade enzimática. Substâncias antioxidantes evitam a formação de radicais livres doando elétrons para evitar a oxidação. Uma substância ao doar um elétron para o DPPH faz com que este se torne mais estável, perdendo sua cor púrpura, permitindo o monitoramento da reação por espectrofotômetro.

**Experimento resumido:** as amostras foram diluídas em DMSO. Em uma placa de 96 poços foi adicionado 292 µL de DPPH (0,3 mM, veículo - metanol:etanol 1:1) e 8 µL das amostras testes, DHA (Ômega-3, *Sigma Aldrich*) a 50µM, vitamina E ( $\alpha$ -tocopherol) substância padrão a 50 µg/mL, e o veículo (DMSO 4%, controle negativo). As soluções foram agitadas por 1 minuto com auxílio do espectrofotômetro de placa (*Fisher Scientific*, modelo Multiskan FC), mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos e a absorbância foi determinada em comprimento de onda 517 nm. (De Gaulejac; Provost; Vivas, 1999).

O percentual de inibição foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$\% \text{ INIBIÇÃO} = [A0 - (Ac \cdot A0)] \times 100$ , onde A0 representa a absorbância do controle negativo e Ac, a absorbância das drogas teste. A Vitamina E funciona como um controle positivo, visto que tem alto potencial antioxidante.

### 5.3.4 Ensaios de atividade anti-inflamatório

O potencial anti-inflamatório dos compostos foi investigado em linhagens de macrófagos (RAW-264.7). Os macrófagos, foram pré-tratados com os compostos puros nas concentrações de 3,5 e 35  $\mu\text{M}$  por 1h, em seguida estimulados com LPS de um Lipopolissacarídeo de bactéria gram-negativa usado para induzir uma resposta inflamatória clássica, com produção de mediadores inflamatórios capazes de serem mensurados (Luster; Alon, Von Aansrian, 2005; Nourshargh; Alon, 2014).

#### 5.3.4.1 Teste de inibição da produção do ON (Óxido nítrico)

O efeito modulador da resposta inflamatória causado pelo tratamento prévio das células com os compostos puros foi realizado através do ensaio de Griess, que é um ensaio colorimétrico, que permite quantificar indiretamente o óxido nítrico (NO), a parti da detecção de nitrito em solução, que é amplamente produzido pelas células que foram desafiadas por LPS (Green; Tannenbaum; Goldman, 1981). O NO é um mediador inflamatório causado principalmente pelo estresse oxidativo da célula que desencadeia outros mediadores e participa da cascata inflamatória.

**Experimento resumido 1** (Compostos obtidos de *L. variegata*): as células RAW-264.7 foram plaqueadas na concentração de  $1,5 \cdot 10^5$  células por mL. Incubadas *overnights* em incubadora de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . As amostras foram diluídas em DMSO (0,4 %) usado como controle negativo (C-) e testadas para avaliação do efeito imunomodulador. Após 1h, alguns grupos foram “desafiados” com endotoxina bacteriana (LPS-*Sigma Aldrich Corp.*), utilizado como controle positivo na concentração de 100 ng/mL. O DHA (Omega-3, *Sigma Aldrich Corp*) à 50  $\mu\text{M}$  foi usado como controle positivo. Após o período de 24h de incubação, 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi coletado para teste de Griess (reagente de Griess - sulfanilamida 1% em ácido acético 30% / N-(-1-naftil)-etilenodiamina 0,1% em ácido acético 60%) em ambiente sem iluminação num período de 10 minutos, tendo a absorbância medida em

espectrofotômetro a 450 nm. A concentração de nitrito ( $\mu\text{M}$ ) foi determinada a partir de uma curva-padrão utilizando solução de  $\text{NaNO}_2$  a uma concentração inicial de 200  $\mu\text{M}$  seguida de diluições seriadas com fator de diluição igual a 2, com a menor concentração sendo 1,56  $\mu\text{M}$ .

**Experimento resumido 2** (Compostos obtidos das algas pardas *D. menstrualis* e *D. mertensii*): Os compostos, em todas as concentrações testadas, inibiram a produção de NO estimulada por LPS em macrófagos RAW-264.7. Os valores de  $\text{CI}_{50}$  dos compostos variaram entre 1,75 – 2,53  $\mu\text{M}$ , valores estes muito próximos ao encontrado com a dexametasona ( $1,53 \pm 0,03 \mu\text{M}$ ), droga anti-inflamatória padrão (Guzik *et al.*, 2013).

#### 5.3.4.2 Ensaio imuno enzimático ELISA

O ensaio imuno enzimático ELISA possibilita dosar a produção de citocinas presente no sobrenadante das células estimuladas pelo LPS. Foram dosadas  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-6}$  citocinas pró-inflamatórias e a  $\text{IL-10}$  uma citocina anti-inflamatória. Essas citocinas pró-inflamatórias são as mais envolvidas na propagação dos sintomas como febre, dor e inchaço no local inflamado. Já a  $\text{IL-10}$  regula a produção das citocinas pró-inflamatórias, controlando a inflamação prolongada, sendo produzida mais tardiamente e impedindo que a inflamação cause danos maiores ao indivíduo, por isso é dita anti-inflamatória (Cayet *et al.*, 2015).

**Experimento resumido:** As amostras foram incubadas em placas com 96 poços com o anticorpo de captura para  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{IL-10}$  e  $\text{IL-6}$  por 16h em temperatura ambiente com 100 $\mu\text{L}$  de anticorpo para cada poço. Posteriormente, as placas foram lavadas e bloqueadas com 300  $\mu\text{L}$  de BSA 1% por 1h. Após o bloqueio, 100  $\mu\text{L}$  das amostras de sobrenadantes das células RAW-264.7 e da curva padrão foram adicionadas em cada poço e incubadas por 2h. As placas foram novamente lavadas e depois incubadas com anticorpo de detecção para  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-10}$  e  $\text{IL-6}$  em temperatura ambiente. Na etapa seguinte as placas foram incubadas com 100  $\mu\text{L}$  de estreptavidina em temperatura ambiente por 20 minutos. Na terceira etapa as placas foram lavadas e adicionado 100  $\mu\text{L}$  da solução substrato para revelação em cada poço e incubado por 20 min à temperatura ambiente, protegido da luz. A absorbância foi medida a 540 nm.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conhecer o potencial biotecnológico dos organismos marinhos do litoral nordestino é de suma importância. Diante disso, o estudo da composição química e efeitos biológicos dos extratos e compostos obtidos neste trabalho contribuem para o enriquecimento científico acerca dos recursos naturais presentes em nosso litoral.

As seguintes conclusões podem ser feitas acerca do trabalho: ESTUDO QUÍMICO DAS ALGAS PARDAS *Lobophora variegata*, *Dictyota menstrualis*, *Dictyota mertensii* e INVESTIGAÇÃO FARMACOLÓGICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS:

A partir dos extratos de *lobophora variegata*, obteve-se nove compostos, sendo dois policetídeos inéditos, os quais apresentaram moderada atividade citotóxica contra as linhagens de células cancerígenas HCT-116 e potente efeito anti-inflamatório em baixas concentrações, tornando-os candidatos promissores para estudos futuros;

Do fracionamento cromatográfico dos extratos da alga parda *D. menstrualis* foi obtido oito diterpenos, sendo três inéditos (Dictyol K, M, N). Estes compostos apresentaram potente efeito de inibição da produção de ON, indicando que concentrações baixíssimas ( $\eta$ M) podem apresentar potente atividade anti-inflamatória. DM-06 apresentou ainda fraca atividade antimicrobiana contra a cepa bacteriana de *S. aureus*

Dos extratos de *D. mertensii* obteve-se cinco compostos, sendo três diterpenos, um inédito, e dois sais de amônia quaternárias. Ambos os compostos apresentaram efeito de inibição da produção de ON, indicando que podem apresentar atividade anti-inflamatória.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ABOU-EL-WAFA, G. S. E.; SHAABAN, M.; SHAABAN, K. A.; EL-NAGGAR, M. E. E.; MAIER, A.; FIEBIG, H. H.; LAATSCH, H. Pachydictyols B and C: New Diterpenes from *Dictyota dichotoma* Hudson. **Marine Drugs**, v. 11, p. 3109-3123, 2013.
- ABDUL, Q. A.; CHOI, R. J.; JUNG, H. A.; CHOI, L. S. Health benefit of fucosterol from marine algae: A review. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v. 96, p.1856-1866, 2016.
- ALARADO, A. B.; GERWICK, W. H. Dictyol H, a new tricyclic diterpenoid from the brown seaweed *Dictyota dentata*. **Journal of Natural Products**, v. 48, p. 132–134, 2004.
- AMICO, V.; CURRENTI, R.; ORIENTE, G.; PIATTELLI, M.; TRINGALI, C. 18-hydroxy 3,7-dolabelladiene from the brown alga, *Dictyota dichotoma*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 848–849, 1981.
- ÁVILA, F. N.; PINTO, F. C. L.; CARNEIRO, P. B. M.; FERREIRA, K. Q.; WILKE, D. V.; NOGUEIRA, N. A. P.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. New antiproliferative polyunsaturated epoxy-heneicosane derivatives isolated from the brown alga *lobophora variegata*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 406–412, 2019.
- AYYAD, S. E.; MAKKI, M. S.; AL-KAYAL, N. S.; BASAIF, S. A.; EL-FOTY, K. O.; ASIRI, A. M.; ALARIF, W. M.; BADRIA, F. A. Cytotoxic and protective DNA damage of three new diterpenoids from the brown alga *Dictoyota dichotoma*. **European Journal of Medicine Chemistry**, v.46, p. 175–182, 2011.
- BERLINCK, R. G. S. Challenges and Rewards of Research in Marine Natural Products Chemistry in Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 510-522, 2004.
- BERNARDINI, S.; TIEZZI, A.; MASCI, V. L.; OVIDI, O. Natural products for human health: an historical overview of drug discovery approaches. **Natural Products Research**, v. 32, n. 16, p. 1926-1950, 2018.
- BIANCO, E. M.; FRANCISCO, T. M.; PINHEIRO, C. B.; AZEREDO, R. B. V.; TEIXEIRA, V. L.; PEREIRA, R. C. 4 $\alpha$ -acetoxyamijidictyol – A new antifeeding dolastane diterpene from the brazilian brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 12, p. 1665-1673, 2015.
- CARDOZO, K. H. M.; GUARATINI, T.; BARROS, M. P. FALCÃO, V. R.; TONON, A. P.; LOPES, N. P.; CAMPOS, S.; TORRES, M. A.; SOUSA, A. O.; COLEPICOLO, P.; PINTO, E. Metabolites from algi with economical impact. **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 146, p. 60-78, 2007.

CARROLL, A. R.; COPP, B. R.; DAVIS R. A.; KEYZERS R. A.; PRINSEP, M. R. Marine Natural Products. **Natural Products Reports**, v.36, p. 122-173, 2019.

CHANG, C.; ZHANG, A. Q.; KAGAN, D. B.; LIU, H.; HUTNIK, C. M. Mechanisms of benzalkonium chloride toxicity in a human trabecular meshwork cell line and the protective role of preservative-free tafluprost. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, v. 43, n. 2, p. 164-172, 2015.

CAI, Y.; WANG, Z.; LI, J.; LI, N.; WEI, F.; LIU, Q. Evaluation of an indirect ELISA using recombinant granule antigen GRA7 for serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats. **Journal of Parasitology**, v. 101, p. 37-40, 2014.

CHEN, J.; LI, H.; ZHAO, Z.; XIA, X.; LI, B.; ZHANG, J.; YAN, X.; Diterpenes from the marine algae of the genus *Dictyota*. **Marine Drugs**, v. 16, n. 159, p. 1-25, 2018.

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

CHUYEN, H. V.; EUN, J. B. Marine carotenoids: Bioactivities and potential benefits to human health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, p. 2600-2610, 2017.

COSTA-LOTUFO, L. V.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; EPIFÂNIO, R. A. Organismos marinhos como fonte de novos fármacos: Histórico e Perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 703-716, 2009.

DA GAMA, B. A. P.; PLOUGUERNÉ, E.; PEREIRA, R. C. The Antifouling Defense Mechanisms of Marine Macroalgae. **Sea Plants**, v. 71, p. 413-440, 2014.

DANISE, B.; MINALE, L.; RICCIO, L.; AMICO, V.; ORIENTE, G.; PIATTELLI, G.; TRINGALI, C.; FATTURUSSO, E.; MAGNO, S.; MAYOL, L. Further perhydroazulene diterpenes from marine organisms. **Experientia**, v. 33, n. 4, p. 413-415, 1976.

DE GAULEJAC, N. S. C.; PROVOST, C.; VIVAS, N. Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 2, p. 425–431, 1999.

DEXY, J.; CHAKRABORTY, K. Enrichment of C<sub>20-22</sub> Polyunsaturated Fatty Acids from Refined Liver Oil of Leafscale Gulper Shark, *Centrophorus squamosus*. **Journal of Aquatic Food Products Technology**, v. 26 p.1042-1056, 2017.

EL GAMAL, A. A. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, p. 1-25, 2010.

EL HATTAB, M.; CULIOLI, G.; VALLS, R.; RICHOU, M.; PIOVETTI, L. Apo-fucoanthinoids and loliolide from the brown alga *Cladostephus spongiosus* f. *verticillatus* (Heterokonta, Sphacelariales). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 447-451, 2008.

FERREIRA, Kayane Queiroz. **Loboforenos inéditos obtidos da alga parda *lobophora variegata* com atividade citotóxica em células tumorais e moduladora da resposta inflamatória de macrófagos**. 2018. 190 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

FONTANA, A.; D'IPPOLITO, G.; CUTIGNANO, A.; ROMANO, G.; LAMARI, N.; GALLUCI, A. M.; CIMINO, G.; MIRALTO, A.; LANORA, A. LOX-Induced Lipid Peroxidation Mechanism Responsible for the Detrimental Effect of Marine *Diatoms* on *Zooplankton Grazers*. **Chembiochem**, v. 8, p. 1810-1818, 2007.

GAYSINSKI, M.; ORTALE-MAGNÉ, A.; THOMAS, O. P.; CULIOLI, G. Extraction, purification, and NMR analysis of terpenes from brown algae. In: DAGMAR B. S.; SOLÈNE, C. **Natural Products From Marine Algae: Methods and Protocols**, Methods in Molecular Biology. New York: Springer Science and Business, vol. 1308, 2015, 439p.

GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate Synthesis in the Germfree and Conventional Rat. **Science**, v. 212, n. 4490, p. 56–58, 1981.

GUELLA, G.; PIETRA, F. Photochemical conversion of xenicane into the crenulatane skeleton with diterpenoids of the brown seaweed *Dictyota* sp. From the coastal of Senegal. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v. 20, p. 1539, 1993.

GUIRY, M. D; GUIRY, G. M. **AlgaeBase**. Worldwide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: <http://www.algaebase.org>. Acesso em: 10 fev. 2019.

GUTIÉRREZ-CEPEDA, A.; FERNÁNDEZ, J. J.; NORTE, M.; MONTALVÃO, S.; TAMMELA, P.; SOUTO, M. L. Acetate-Derived Metabolites from the Brown Alga *Lobophora variegata*. **Journal of Natural Products**, v. 78, p. 1716-1722, 2015.

GUZIK, T.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation. **Journal of physiology and pharmacology**, v. 54, n. 4, p. 469-487, 2003.

HAN, Y. M.; KIM, K. N.; LEE, W. J.; LEE, N. H.; HYUM, C. G.; Chemical constituents from *Sargassum micracanthum* and Antioxidant activity. **International Journal of Pharmacology**, v. 6, p.147-151, 2010.

HIRSCHFELD, D. R.; FENICAL, W.; LIN, G. H. Y. RADLICK, R. M. SIMS J. J. Marine Natural Products.VIII. Pachydictyol A, anexceptional diterpene alcohol from the brown alga *Pachydictyon coriaceum*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 95, n. 12, p. 4049-4050, 1973.

IOANNOU, E.; ZERVOU, M.; ISMAEL, A.; KTARI, L.; VAGIAS, C.; ROUSSIS, V. 2,6-Cyclo-xenicanes from the brown algae *Dilophus fasciata* and *Dilophus spiralis*. **Tetrahedron**, v. 65, p. 10565-10572, 2009.

IRELAND, C.; FAULKNER, D. J.; FINER, J.; CLARDY, J. Novel diterpenes from *Dolabella californica*. **Journal of the America Chemical Society**, v. 98, p. 4664-4665, 1976.

ISHITSUKA, M. O.; KUSUMI, T.; KAKISAWA, H.; KAWAKAMI, Y.; NAGAI, Y.; SATO, T. Structure and conformation of pachylactone, a new diterpeno isolated from the brown alga *Pachydictyon coriaceum*. **Tetrahedron Letters**, v. 24, n. 46, p. 5117-5120, 1983.

ISHITSUKA, M. O.; ICHIKAWA, A.; KUSUMI, T.; KAKISAWA, H. Existence of a termite soldier diterpene-like substances in the dictyotaceae algae. **Symposium of Chemistry Natural Products**, p. 188–195, 1988.

ISHITSUKA, M. O.; KUSUMI, H.; ICHIKAWA, A.; KAKISAWA, H. Bicyclic diterpenos from two species of brown algae of the Dictyotaceae. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2605-2610, 1990.

KIMURA, J.; MAKI, N. New loliolide derivatives from the brown alga *Undaria pinnatifida*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 57-58, 2002.

KOLESNIKOVA, S. A.; KALINOVSKY, A. I.; FEDOROV, S. N.; SHUBINA, L. K.; STONIK, V. A. Diterpenes from the far-eastern brown alga *Dictyota dichotoma*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2115–2119, 2006.

KOLENISKOVA, S. A.; LYAKHOVA, E. G.; KALINOVSKY, A. I.; DMITRENOK, P. S.; DYSHLOVOY, S. A. STONIK, V. A. **Australian Journal of Chemistry**, v. 62, p. 1185-1188, 2009.

KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; STICHER, O. New xenicane and hydroazulenoid diterpenes from an Australian collection of *Dictyota divaricata*. **Tetrahedron**, v. 22, p.1399–1410, 1991)

LEE, R. E. **Phycology**. 4. ed. Cambridge: University Press, 2008. 561 p.

LIN, Z. X.; HOULT, J. R.; RAMAN, A. Sulphorhodamine B assay for measuring proliferation of a pigmented melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vitiligo. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 66, p. 141-150, 1999.

LUSTER, A. D.; ALON, R.; VON ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: Present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1182–1190, 2005.

MIDLARD, S. L.; WING, R. M.; SIMS, J. J. New Crenulides from the Sea Hare *Aplysia vaccaria*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 48, n. 11, p. 1906-1909, 1982.

MONTASER, H.; LUESCH, H. Marine natural products: A new wave of drugs?. **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, p. 1475-1489, 2011.

MOO-PUC, R.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRI ´N, Y. In vitro cytotoxic and antiproliferative activities of marine macroalgae from Yucata ´n, Mexico. **Ciencias Marinas**, v. 35, P. 345–358, 2009.

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

MOURA, L.; A.; ALMEIDA, A. C. M.; DOMINGOS, T. F. D.; ORTIZ-RAMIREZ, F.; CAVALCANTI, D. N.; TEIXEIRA, V. L. Antiplatelet and anticoagulant effects of diterpenes isolated from the marine alga *Dictyota menstrualis*. **Marine Drugs**, v. 12, p. 2471-2484, 2014.

NOURSHARGH, S.; ALON, R. Leukocyte Migration into Inflamed Tissues. **Immunity**, v. 41, n. 5, p. 694-707, 2014.

ØVERLAND, M.; MYDLAND, L. T.; SKREDE, A. Marine macroalgae as sources of protein and bioactive compounds in feed for monogastric animals. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, p. 13-24, 2019.

PAPAZISIS, K. T.; GEROMICHALOS, G. D.; DIMITRIADIS, K. A.; KORTSARIS, A. H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 208, n. 2, p. 151-158, 1997.

PERCOT, A.; YALÇIN, A.; AYSEL, V.; ERDUGAN, H.; DURAL, B.; GUVEN, K. G. Loliolide in marine algae. **Natural Products Research**, v. 23, n.5, p. 460-465, 2009.

RAHELIVAO, M. P.; GRUNER, M.; ANDRIANMANANTOANINA, H.; BAUER, I.; KNOLKER, H. J. Brown Algae (Phaeophyceae) from the Coast of Madagascar: preliminary Bioactivity Studies and Isolation of Natural Products. **Natural Products Bioprospecting**, v. 5, p. 223-235, 2015.

REPETA, D.J. Carotenoid diagenesis in recent marine sediments: II. Degradation of fucoxanthin to loliolide. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 53, p. 699-707, 1989.

RIVERA, A. P.; ASTUDILLO, L. A.; GONZALEZ, A. G.; MANTA, E.; CATALDO, F. Two new bicyclic diterpenoids from the brown alga *Glossophora kuntii*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 5, p. 965-967, 1987.

ROSA, S.; STEFANO, S.; ZAVODNIK, N. Hydroazulenoid diterpenes from the brown alga *Dictyota dichotoma*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 9, p. 2179-2181, 1986.

RUBIANO-BUITRAGO, R.; DUQUE, F.; PUYANA, M. RAMOS, F. A.; CASTELLANOS, L. Bacterial biofilm inhibitor diterpenes from *Dictyota pinnatifida* collected from the Colombia caribbean. **Phytochemistry Letters**, v. 30, p. 74-80, 2019.

RUIZ-TORRES, V.; ENCIMAR, J. A.; HERRANZ-LÓPEZ, M.; PÉREZ-SÁNCHEZ, A.; GALIANO, V.; BARRAJÓN-CATALÁN, E.; MICOL, V. An Updated Review on Marine

Anticancer Compounds: The Use of Virtual Screening for the Discovery of Small-Molecule Cancer Drug. **Molecules**, v. 22, p. 1000-1037, 2017.

RUOCCO, N.; CONSTANTINI, S. COSTANTINI, M. Blueprint Autophagy: Potencial for cancer treatment. **Marine Drugs**, v. 14, p. 138-155, 2016

RUSSO, C.; KUNDI, M.; LAVORGNA, H.; PARRELLA, A.; ISIDORI, M. Benzalkonium Chloride and Anticancer Drugs in Binary Mixtures: Reproductive Toxicity and Genotoxicity in the Freshwater Crustacean *Ceriodaphnia dubia*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 74, n. 4, p. 545-556, 2018.

SAHOO, D.; SECKBACH, J. **The algae World**: Cellular origin, Life in extreme habitats and Astrobiology. 1. ed. Jerusalem: Springer, 2015, 594 p.

SAQIB, U.; SARKAR, S.; SUK, K.; MOHAMMADA, O.; BAIG, M. S.; SAVAI, R. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. **Oncotarget**, v. 9, n. 25, p. 17937–17950, 2018.

SATHYASEELAN, T.; MURUGESAN S.; SIVAMURUGAN, V. Structural identification and antioxidant properties of methanolic extract of brown algae *Lobophora variegata* (JVF Lamouroux) Womersley ex EC Oliveira. **International Journal of Innovation in Pharma Biosciences and Research Technology**, v. 2, p. 165–178, 2015.

SCHULTZ, N. E.; LANE, C. E.; LE GALL, L.; GEY, G.; BIGNEY, A. R.; REVIERS, B.; ROUSSEAU, F.; SCHNEIDER, C. W.; A barcode analysis of the genus *Lobophora* (*Dictyotales*, *Phaeophyceae*) in the western Atlantic Ocean with four novel species and the epitypification of *L. variegata* (J.V. Lamouroux) E.C. Oliveira. **European Journal of Phycology**, v. 50, p. 481-500, 2015.

SILBERFELD, T.; LEIGH, W. J.; VERBRUGGEN H. C. C.; REVIERS B.; ROUSSEAU F. A multi-locus time-calibrated phylogeny of the brown algae (*Heterokonta*, *Ochrophyta*, *Phaeophyceae*): investigating the evolutionary nature of the “brown algal crown radiation”. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 56, p. 659–674, 2010.

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

SOUSA, C. B.; GANGHADAR, K. N.; MACRIDACHIS, J.; PAVAO, M.; MORAES, T. R.; CAMPINO, L.; VARELA, J.; LAGO, J. H. G. *Cystoseira algae* (*Fucaceae*): update on their chemical entities and biological activities. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 28, p. 1486-1505, 2017.

SUN, H. H.; MCENROE, F. J.; FENICAL, W. Acetoxicrenulide, a new bicyclic cyclopropane-containing diterpenoids from the brown seaweed *Dictyota crenulata*. **Journal of Organic Chemistry**, v. 48, p. 1903-1906, 1982.

TEIXEIRA, V. L.; CAVALCANTI, D. N.; PEREIRA, R. C. Chemotaxonomic study of the diterpenes from brown alga *Dictyota menstrualis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 313-326, 2001.

TEIXEIRA, V. L.; KELECOM, A. A chemotaxonomic study of diterpenes from marine brown algae of the genus *Dictyota*. **Science of the Total Environment**, v. 75, p. 271–283, 1988.

TSUKIDA, K.; SAIKI, K.; SUGIURA, M. Structural elucidation of the main  $\beta$ -carotenes. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 27, 551-561, 1981.

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, p. 1–16, 2005.

VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, p. 1112-1126, 2016.

VIEIRA, C.; DE CLERK, O.; D'HONDT, S.; PAYRI, C. Toward an inordinate fondness for stars, beetles and *Lobophora*? Species diversity of the genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) in New Caledonia. **Journal of Phycology**, v. 50, p. 1101-11-19, 2014.

VIEIRA, C.; GAUBERT, J.; DE CLERK, O.; PAIRY, C.; CULIOLI, G.; THOMAS, O. P. Biological activities associated to the chemodiversity of the brown algae belonging to genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) **Phytochemistry Reviews**, v.16, p. 1-17, 2015.

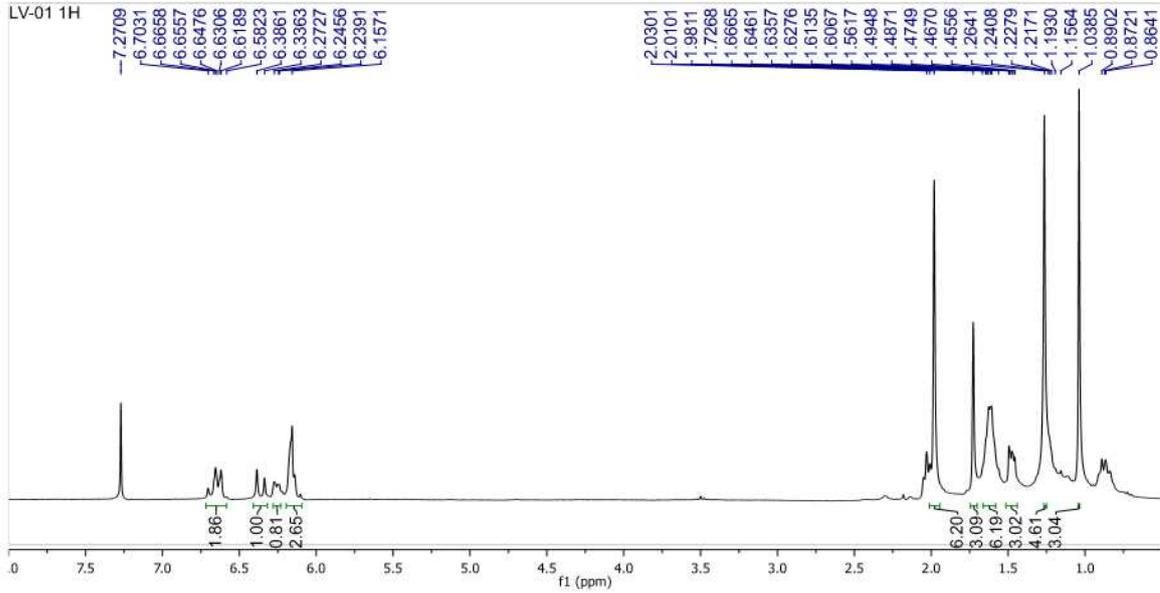
VIEIRA, C.; THOMAS, O. P.; CULIOLI, G.; GENTA-JOUVE, G.; HOULBREQUE, F.; GAUBERT, J.; DE CLERCK, O.; PAYRI, C. E. Allelopathic interactions between the brown algal genus *Lobophora* (Dictyotales, Phaeophyceae) and *scleractinian* corals. **Scientific Report**, v. 6, p. 18637-18648, 2017.

WANG, T-Z.; PINARD, E.; PAQUETTE, A. Total Synthesis of Natural (+) - Acetoxycrenulide. **Journal of America Chemical Society**, v. 118, p. 1309-1318, 199.

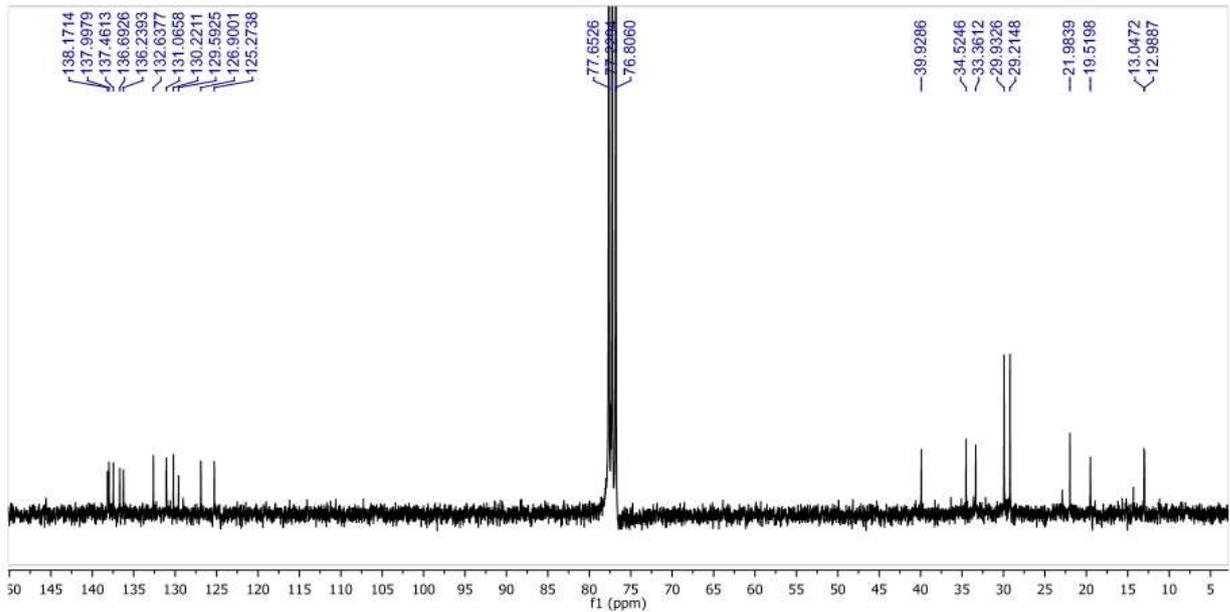
ZENG, X.; XIANG, L.; LI, C. Y.; WANG, Y.; QIU, G.; ZHANG, Z. X.; HE, X. Cytotoxic ceramides and glycerides from roots of *Livistona chinensis*. **Fitoterapia**, v. 83, p. 609-616, 2012.

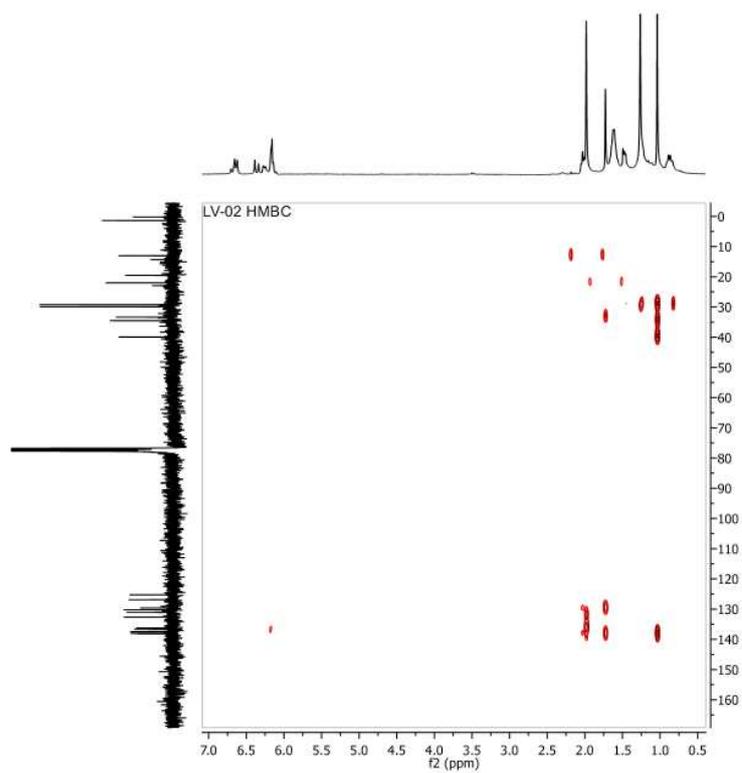
**APÊNDICE A – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-01**

**A1: ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H (CDCL<sub>3</sub>, 300 MHZ) DE LV-01**



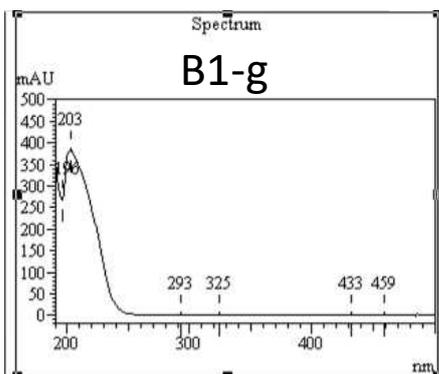
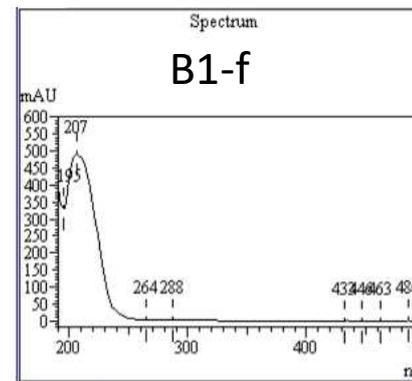
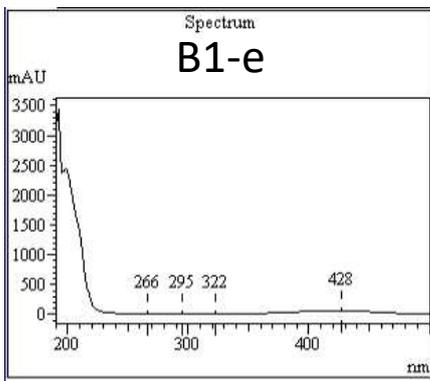
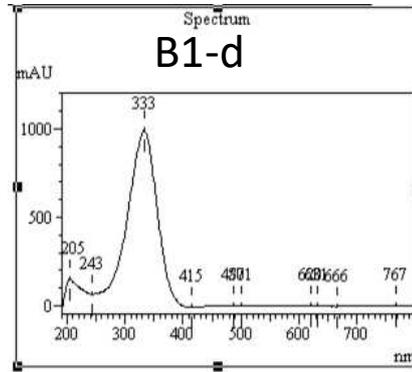
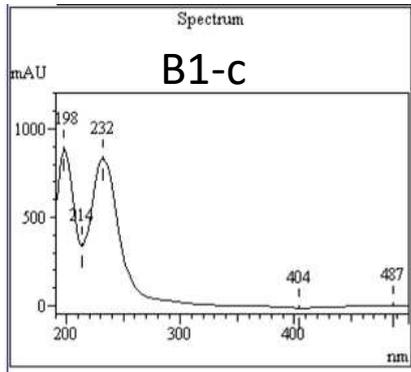
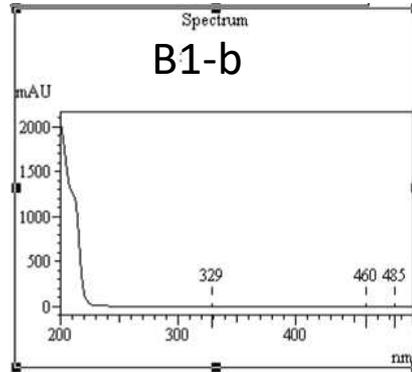
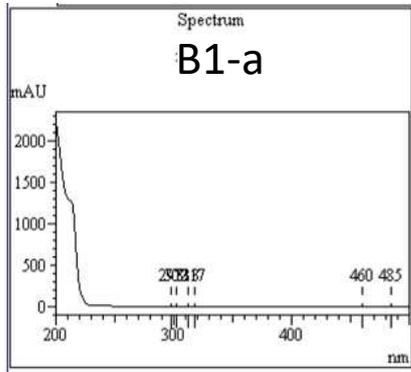
**A2: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup>C (CDCL<sub>3</sub>, 75 MHZ) DE LV-01**



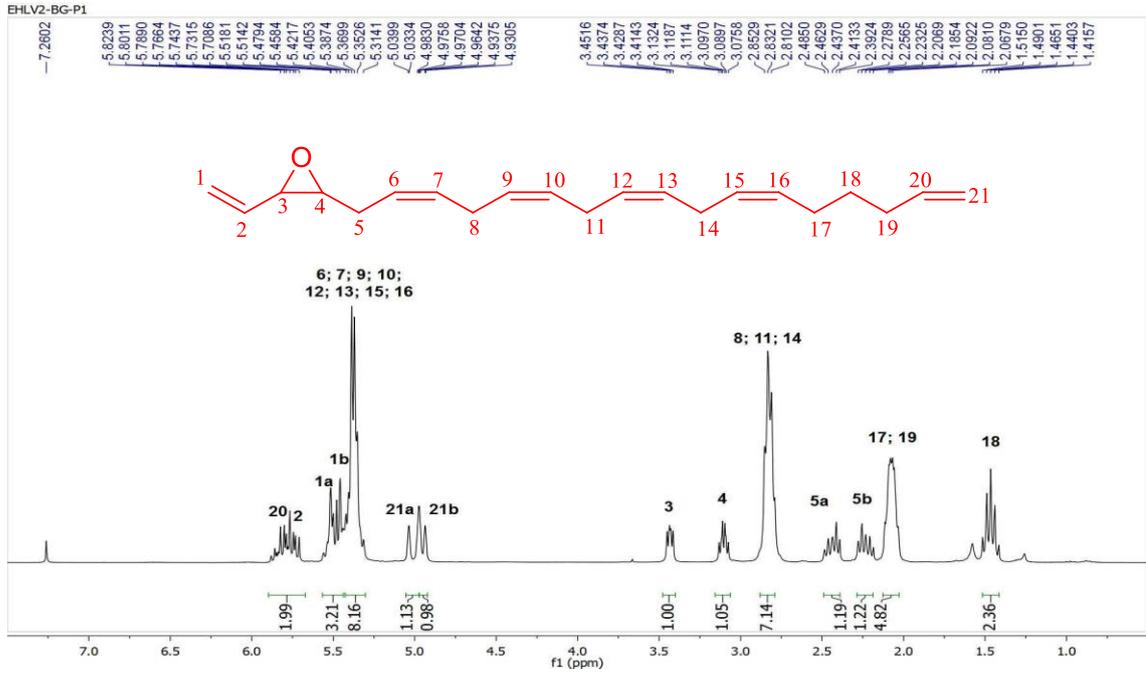
**A3: ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE LV-01**

**APÊNDICE B – DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  UNI E BIDIMENSIONAIS PARA  
ELUCIDAÇÃO DE LV-02**

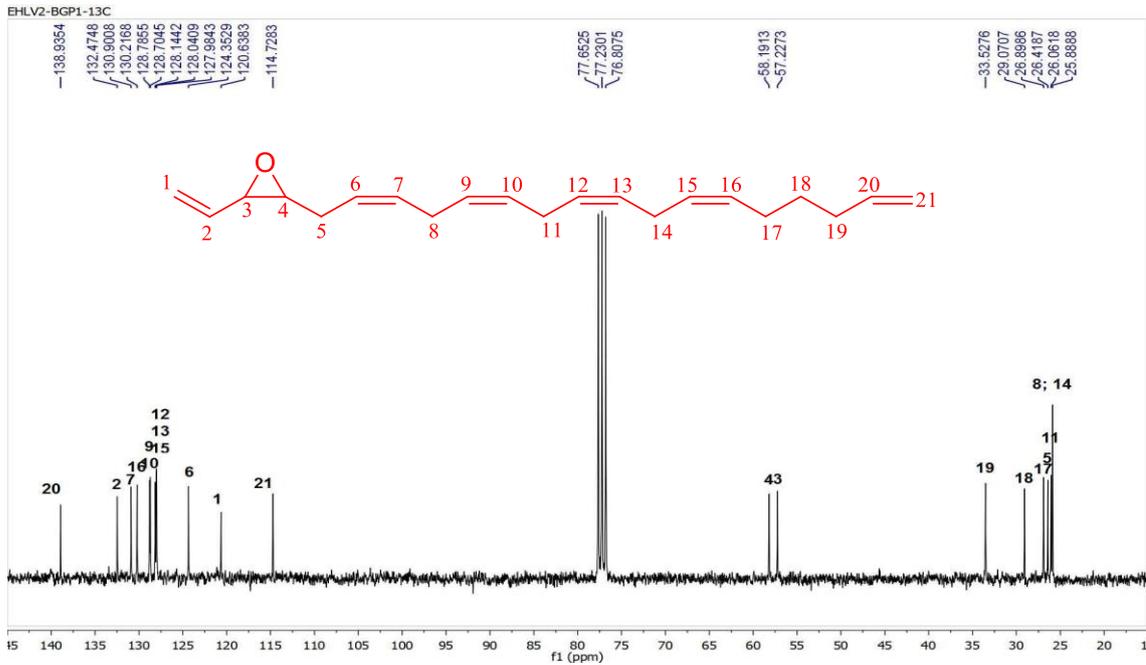
**B1: DADOS DE UV OBTIDOS POR HPLC-DAD**



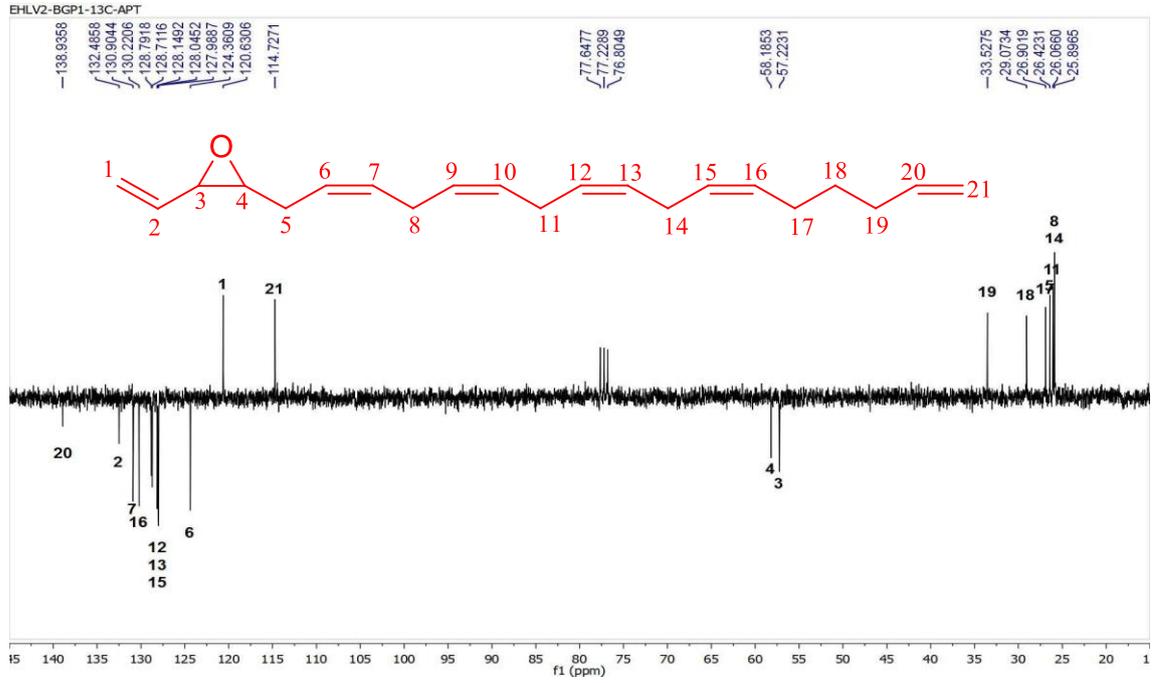
### B2: ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 500 MHZ) DE LV-02



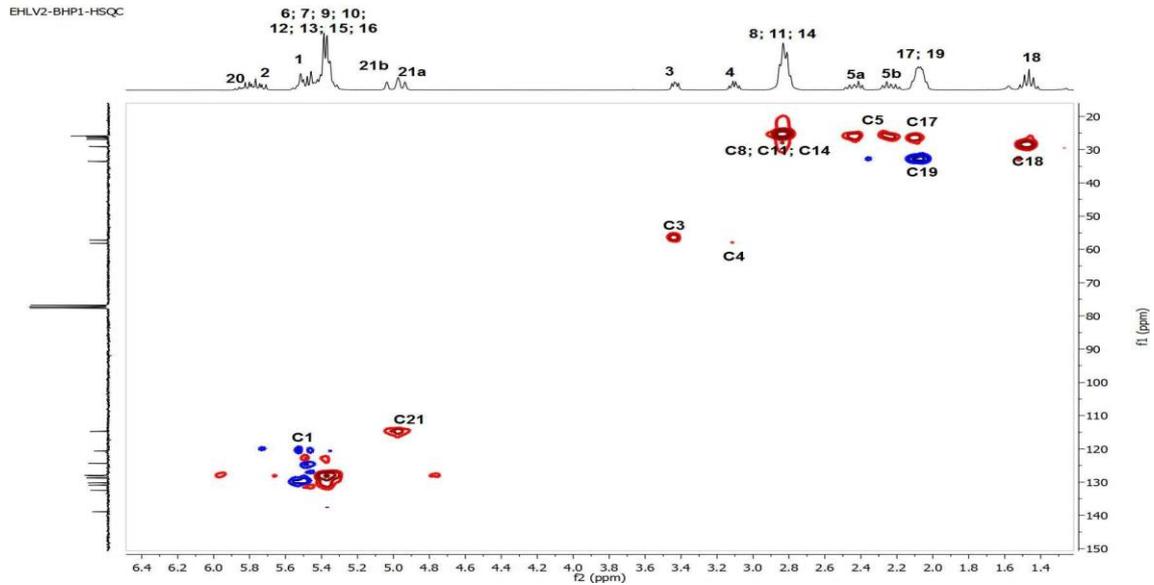
### B3: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup>C BB (CDCl<sub>3</sub>, 125 MHZ) DE LV-02



### B4: ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ APT DE LV-02



### B5: ESPECTRO DE RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC DE LV-02

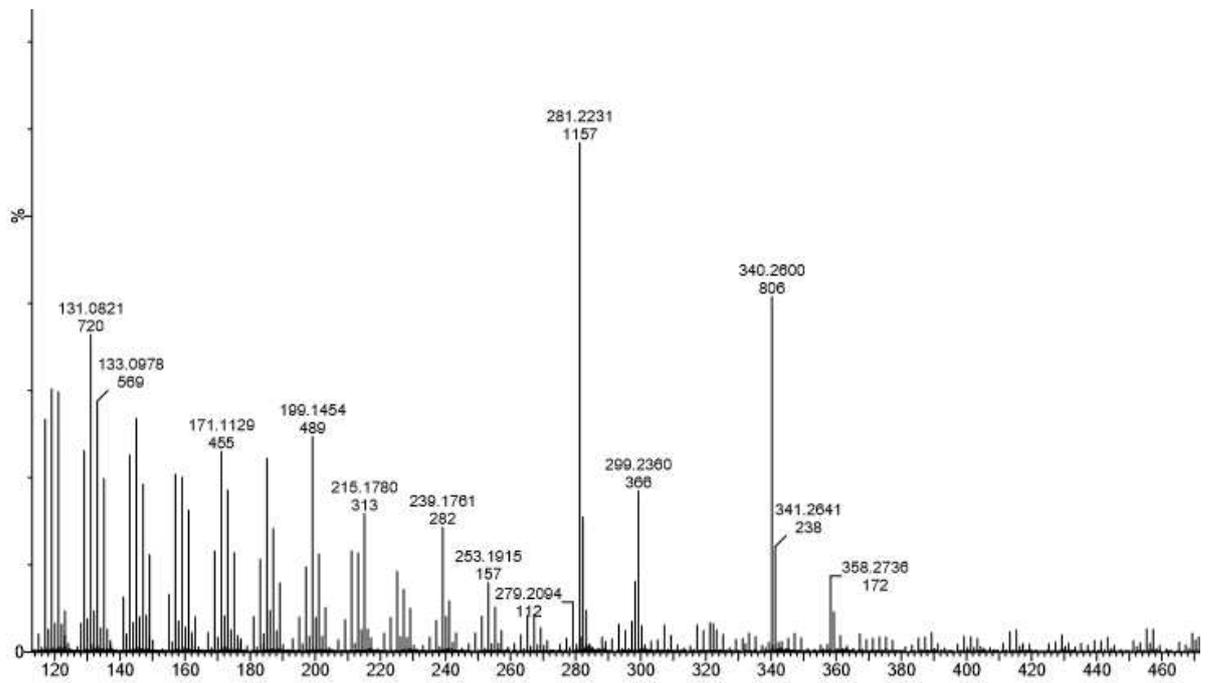
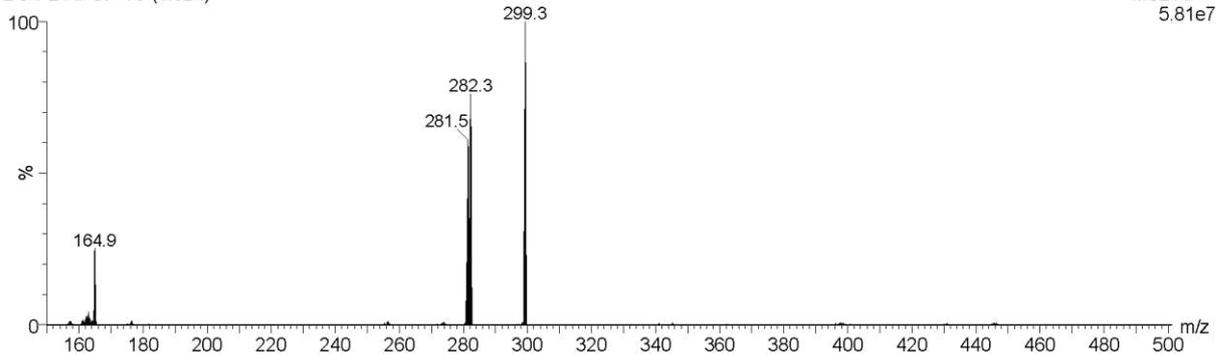




**B8: ESPECTROS DE MASSAS DE LV-02 (EM-APCI E EMAR-ESI)**

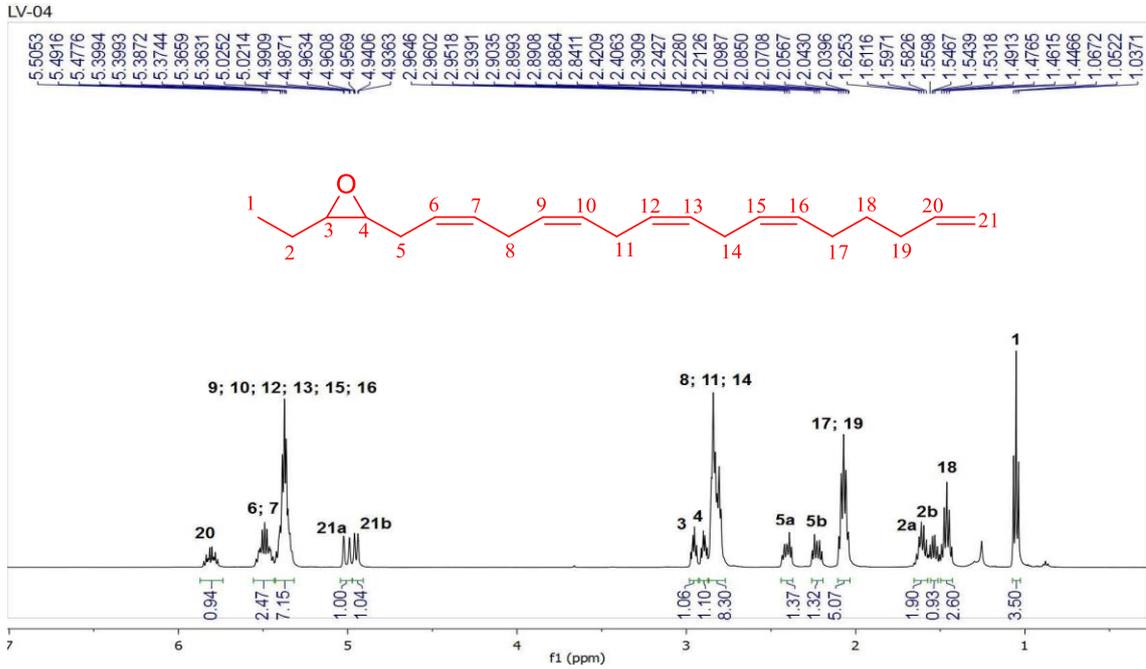
Amostra BG-P2 modo APCI+

BG-P2-APCI+ 79 (1.324)

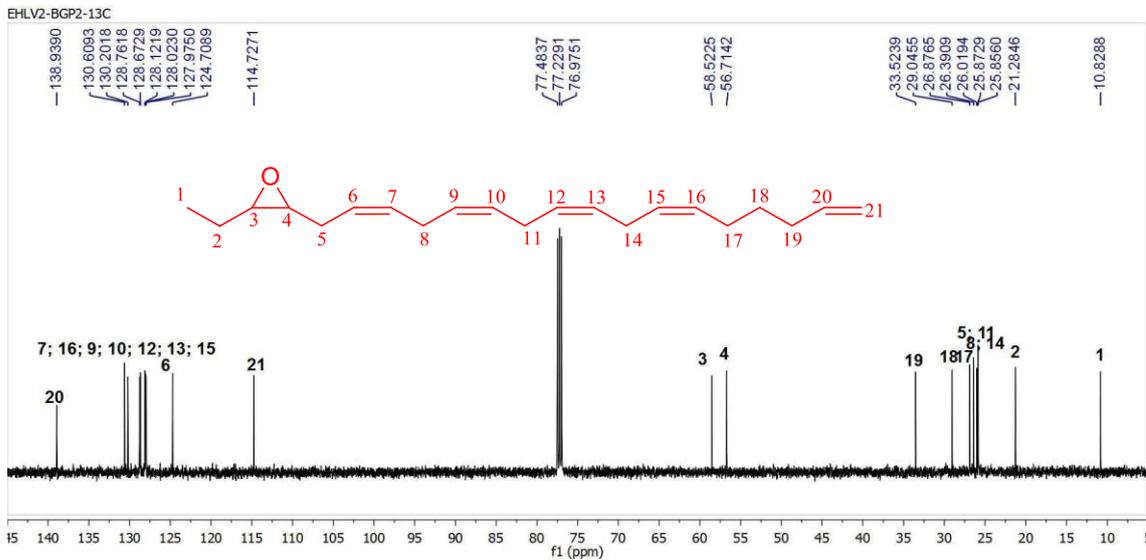
MS2 AP+  
5.81e7

**APÊNDICE C – DADOS DE RMN <sup>1</sup>H E <sup>13</sup>C UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-03**

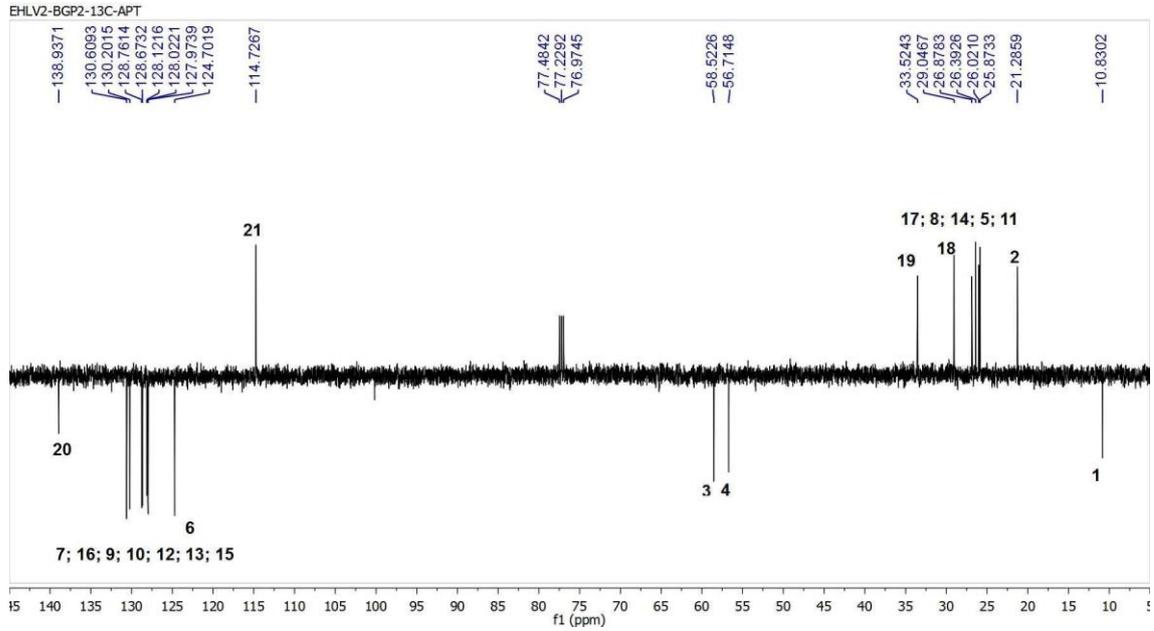
**C1: ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H (CDCL<sub>3</sub>, 500 MHZ) DE LV-03**



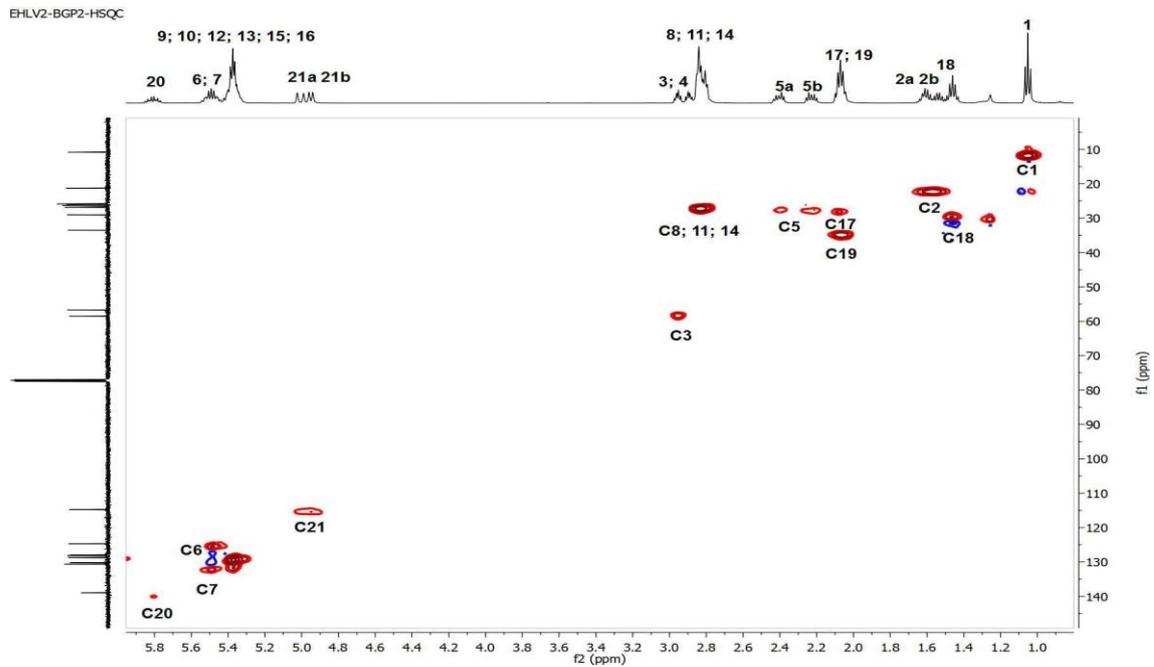
**C2: ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup>C BB (CDCL<sub>3</sub>, 125 MHZ) DE LV-03**



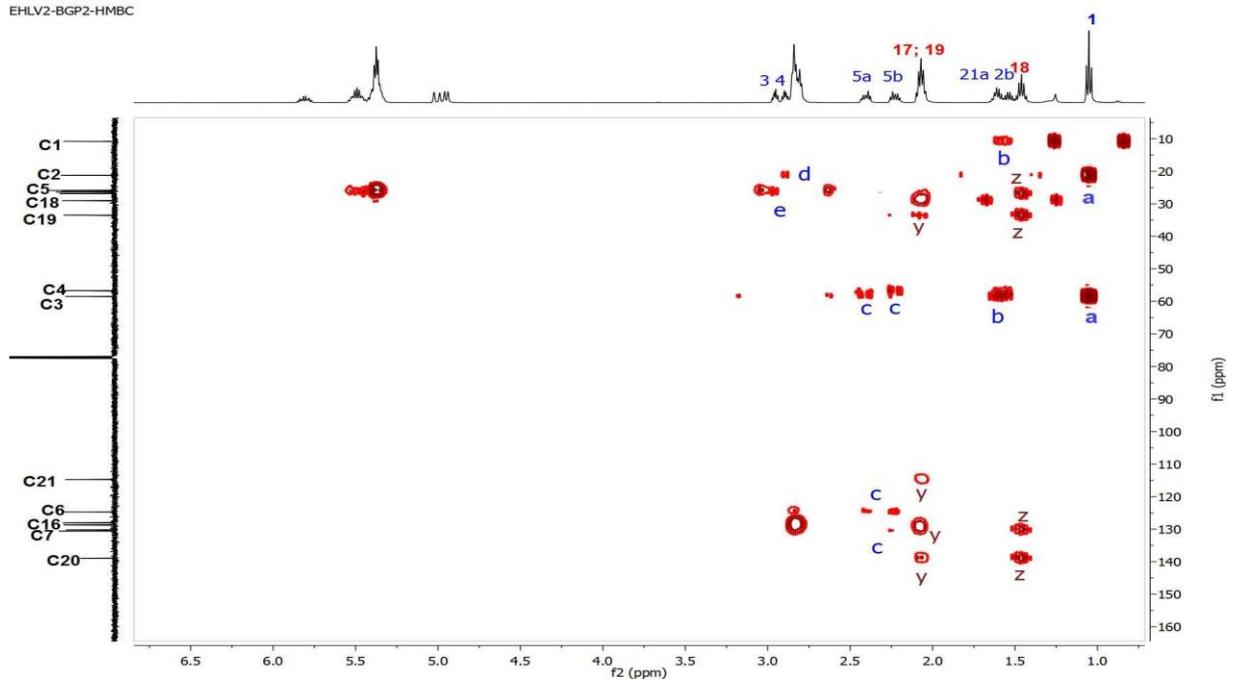
### C3: ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ APT (CDCL $_3$ , 125 MHZ) DE LV-03



### C4: ESPECTRO DE RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC DE LV-03



### C5: ESPECTRO DE RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HMBC DE LV-03

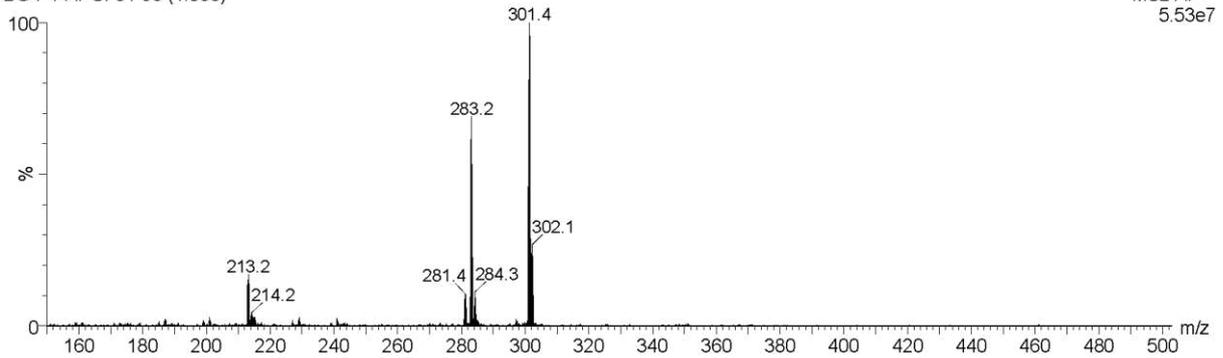


### C6: ESPECTRO DE MASSAS DE LV-03 (EM-APCI)

Amostra BG-P1 modo APCI+

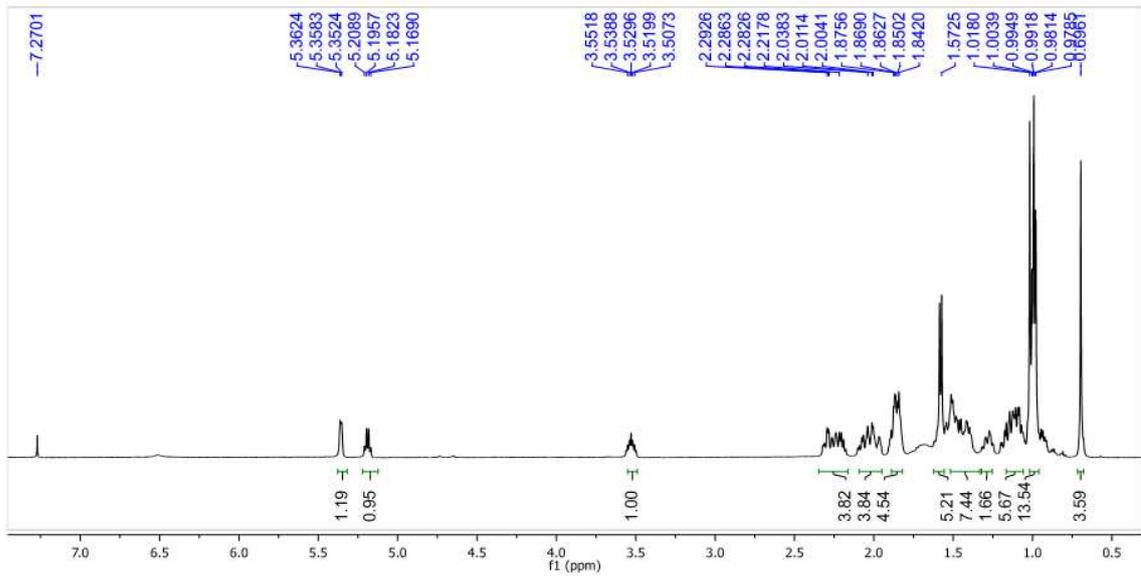
BG-P1-APCI-01 90 (1.508)

MS2 AP+  
5.53e7

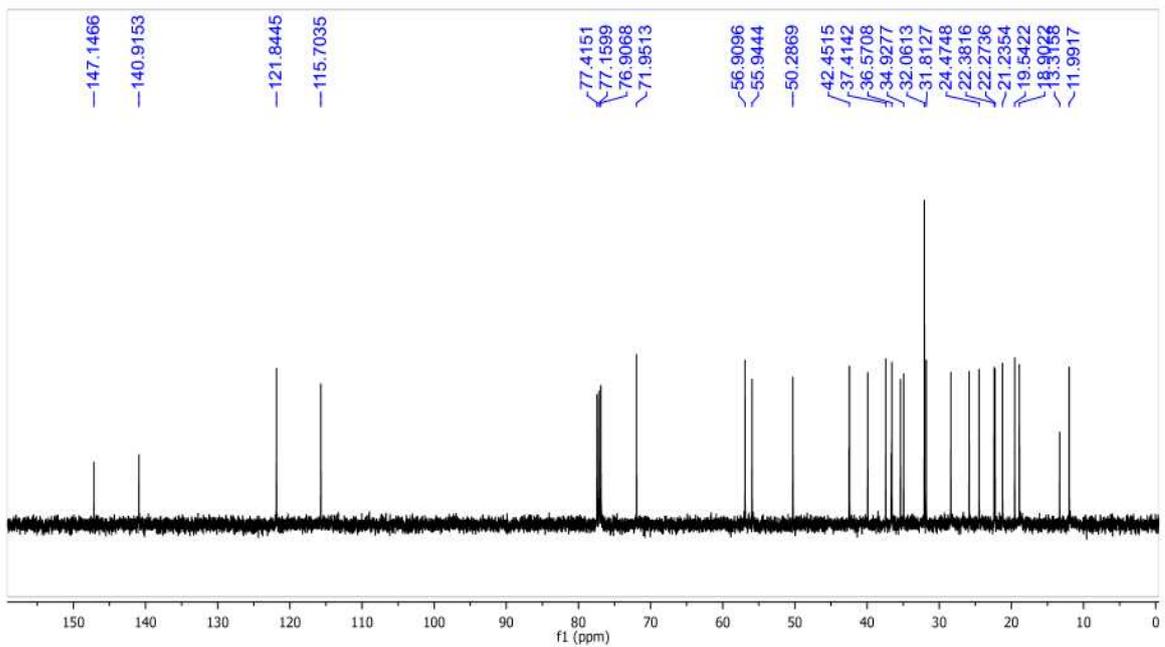


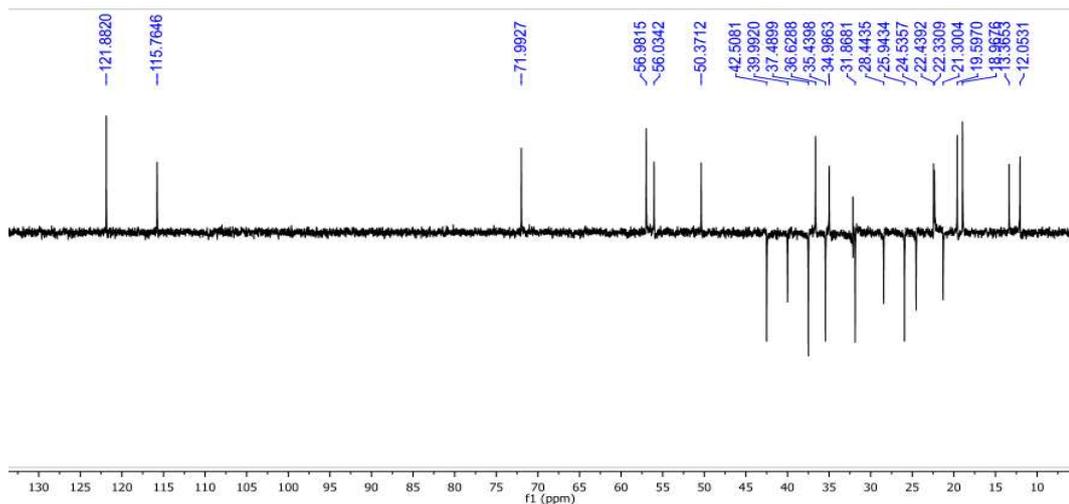
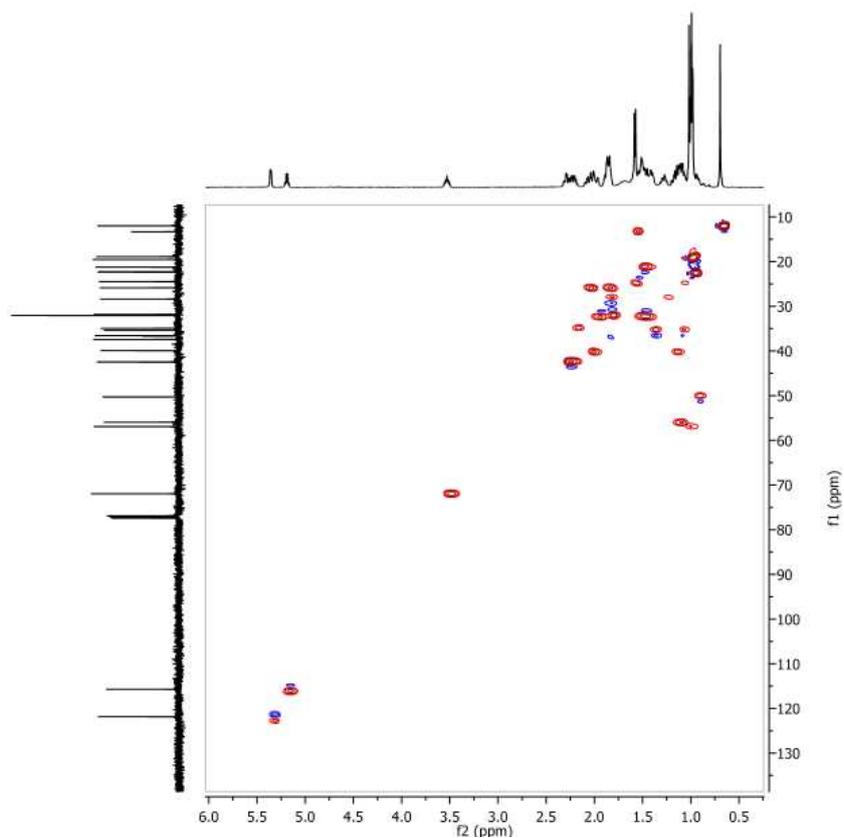
APÊNDICE D – DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  UNI E BIDIMENSIONAIS PARA  
ELUCIDAÇÃO DE LV-04

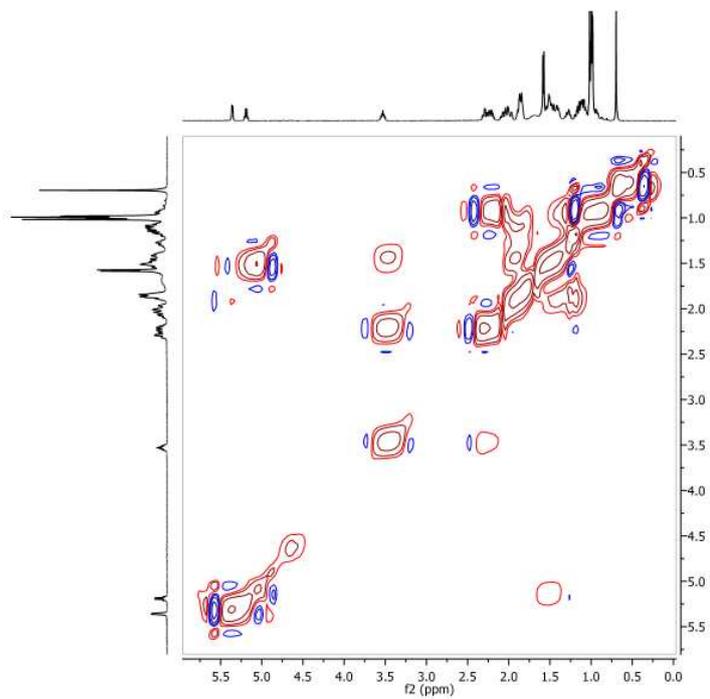
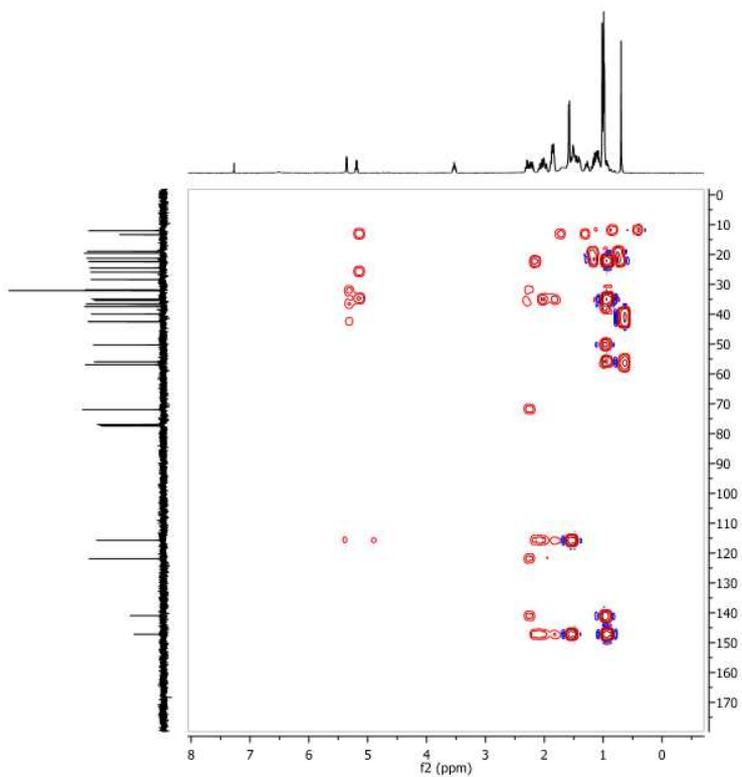
D1: ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) DE LV-04



D2: ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) DE LV-04

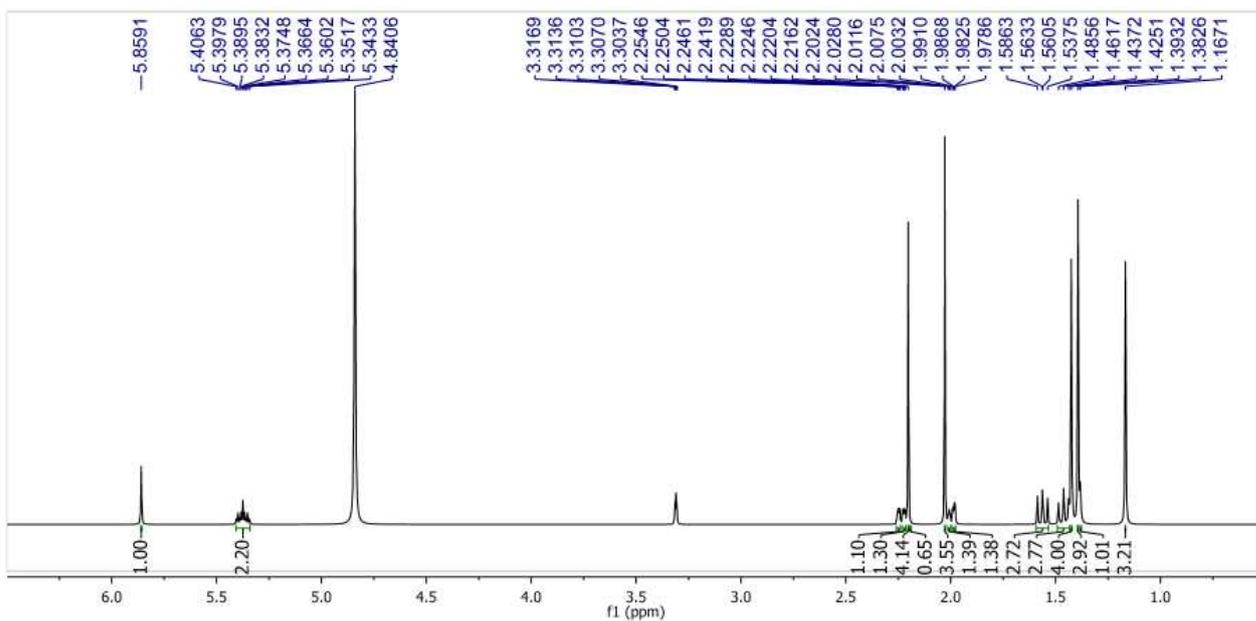


**D3: ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  APT DE LV-04****D4: ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC DE LV-04**

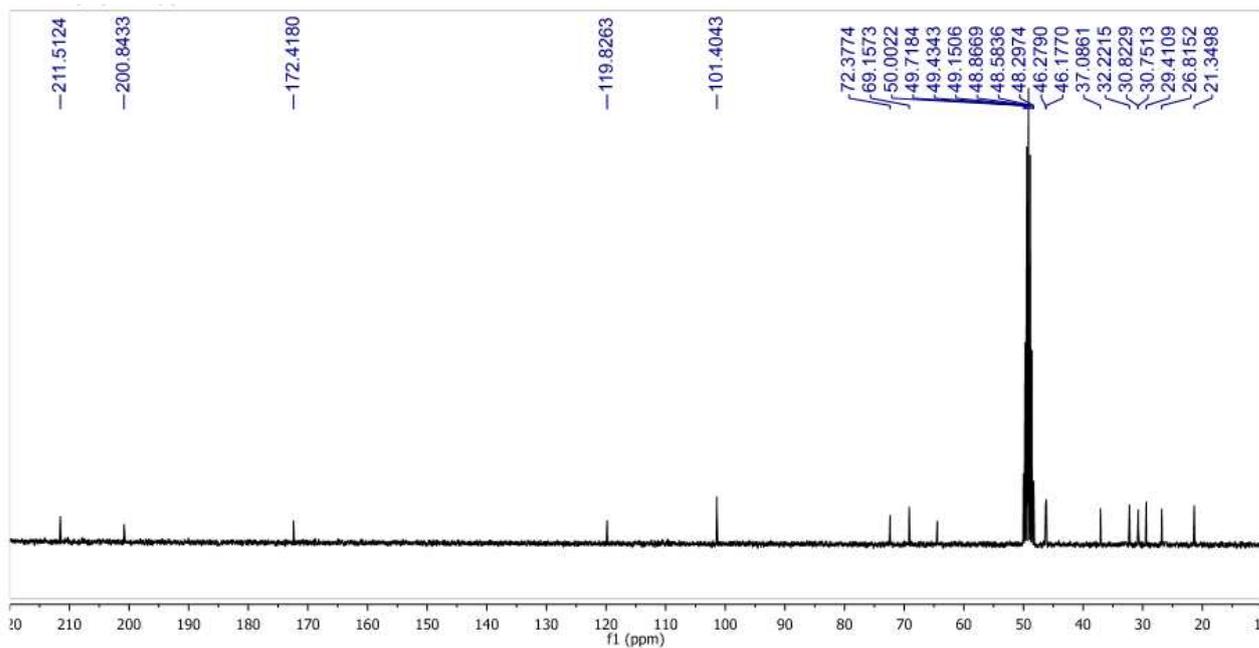
**D5: ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY DE LV-04****D6: ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE LV-04**

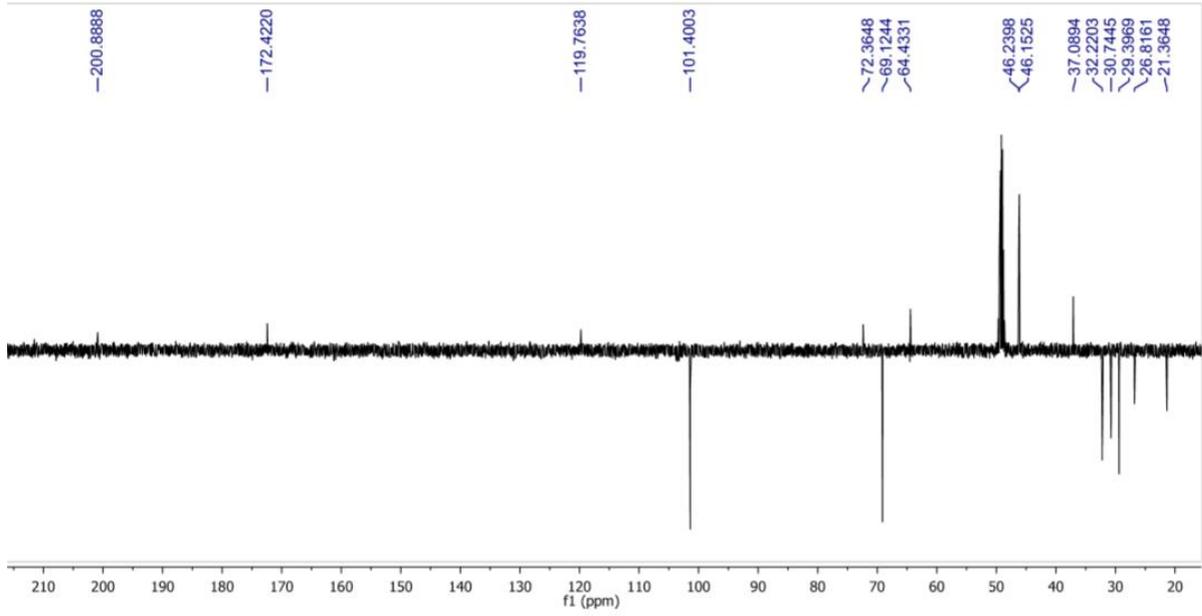
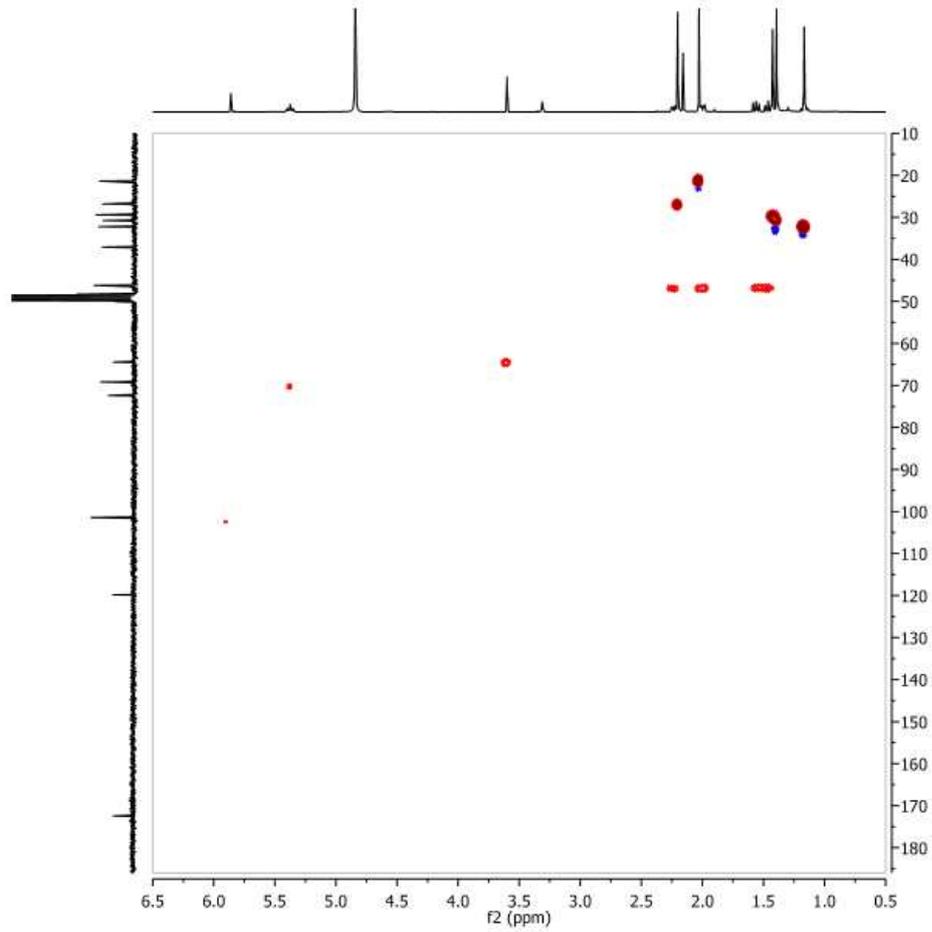
## APÊNDICE E – DADOS DE RMN $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-05

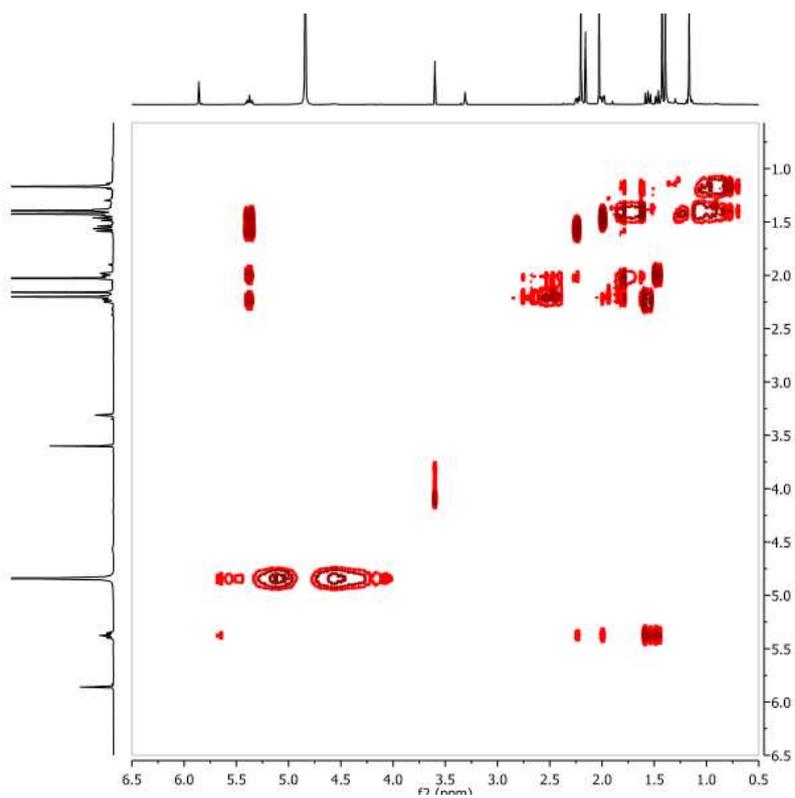
### E1: ESPECTRO DE RMN $^1\text{H}$ LV-05



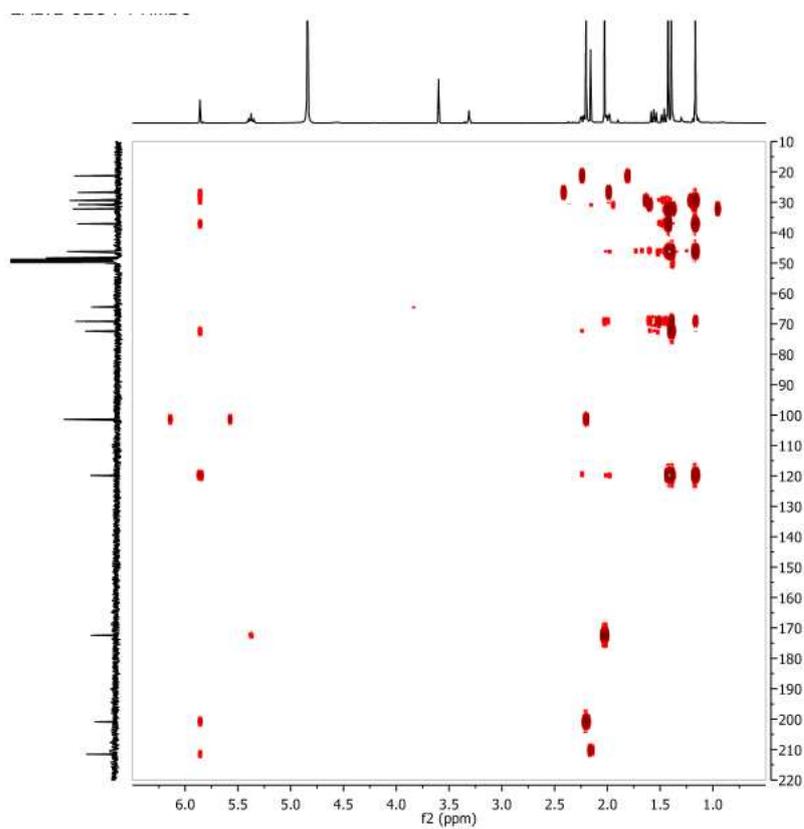
### E2: RMN $^{13}\text{C}$ LV-05

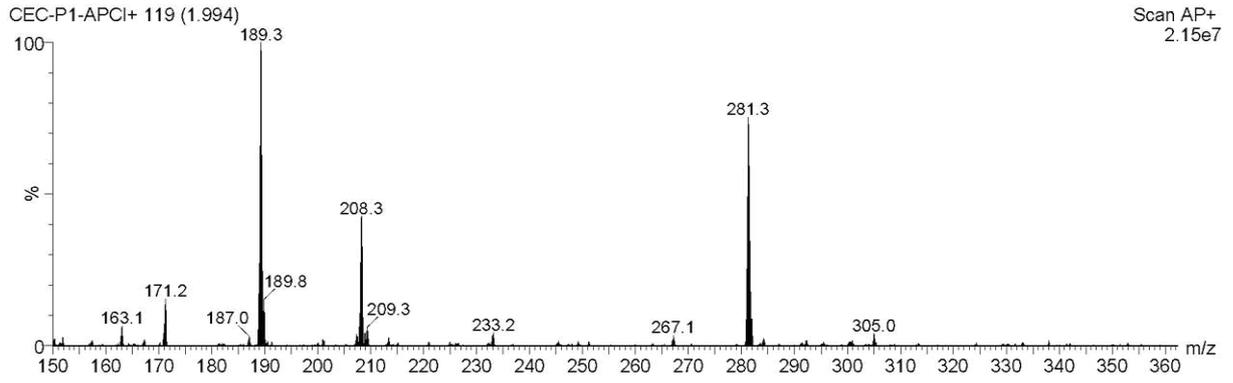


**E3: RMN  $^{13}\text{C}$  APT LV-05****E4: RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  HSQC LV-05****E5: RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY LV-05**



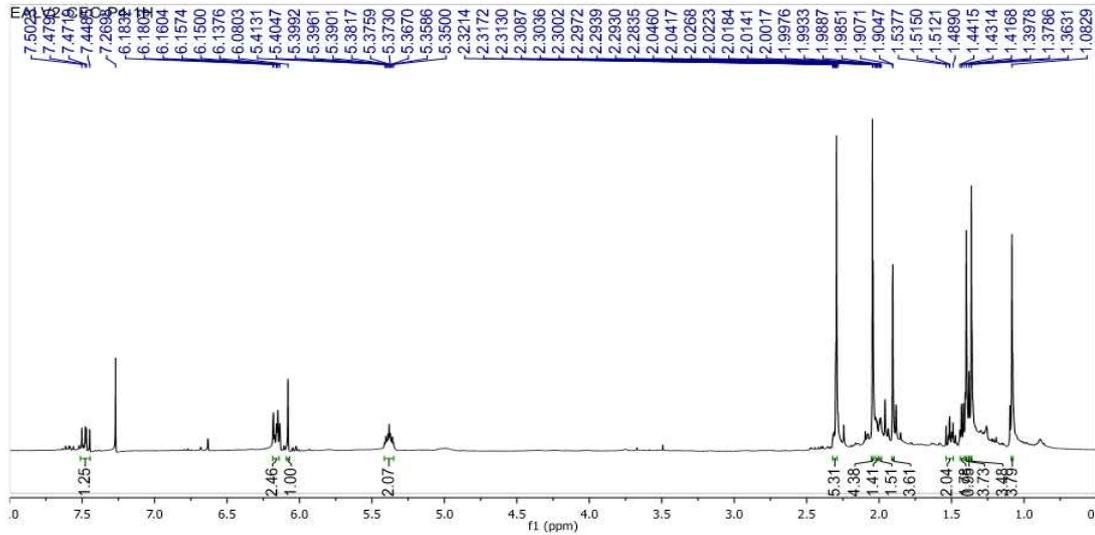
**E6: RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC LV-05**



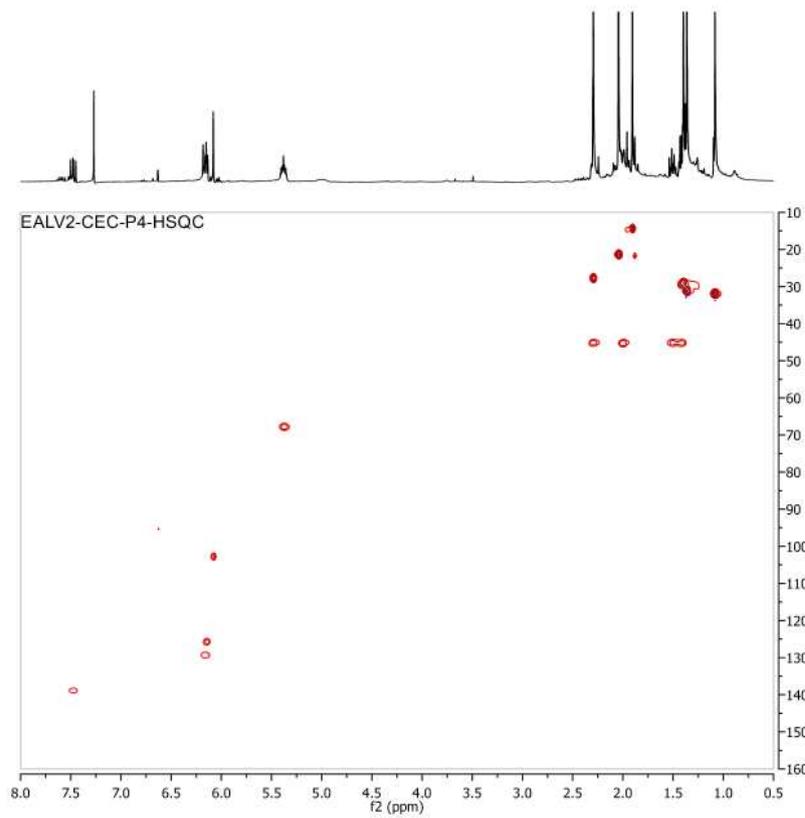
**E7: ESPECTRO DE MASSAS DE LV-05 (EMAR-APCI)**

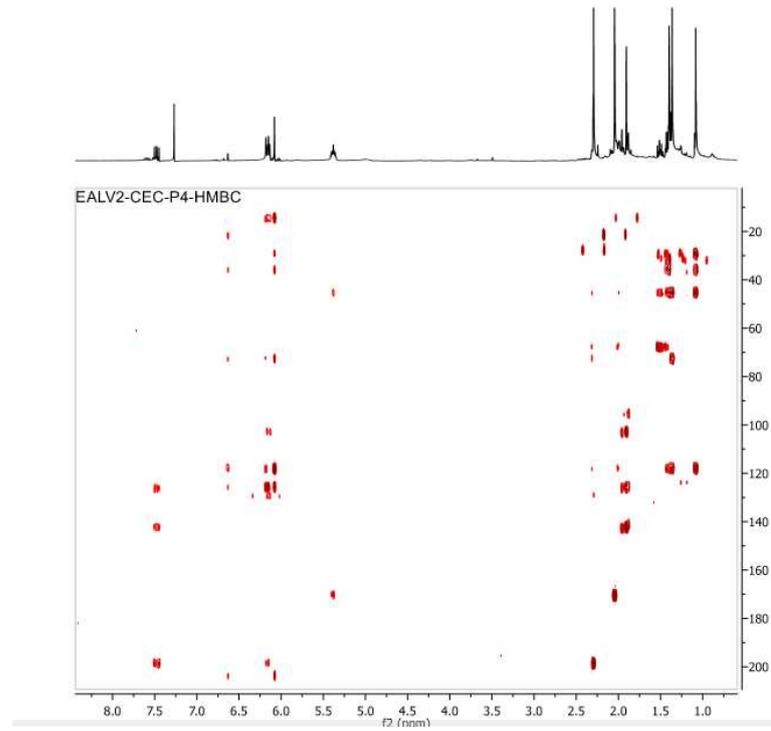
APÊNDICE F – DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  UNI E BIDIMENSIONAIS PARA  
ELUCIDAÇÃO DE LV-06

F1: RMN  $^1\text{H}$  LV-06

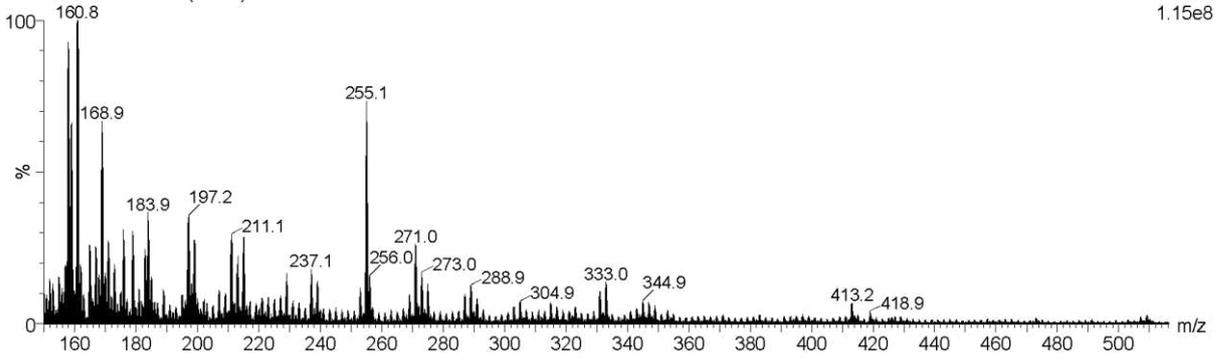


F2: RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  HSQC LV-06



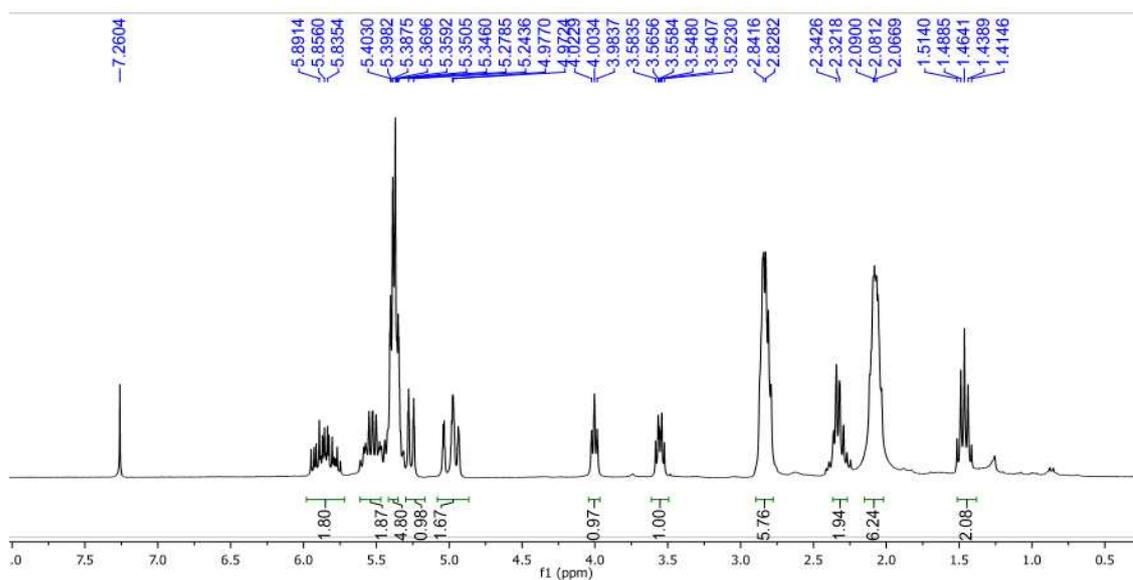
**F3: RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC LV-07****F4: ESPECTRO DE MASSAS DE LV-06 (EMAR-APCI)****Amostra CEC-P4 modo APCI+**

CEC-P4-APCI-01 124 (2.078)

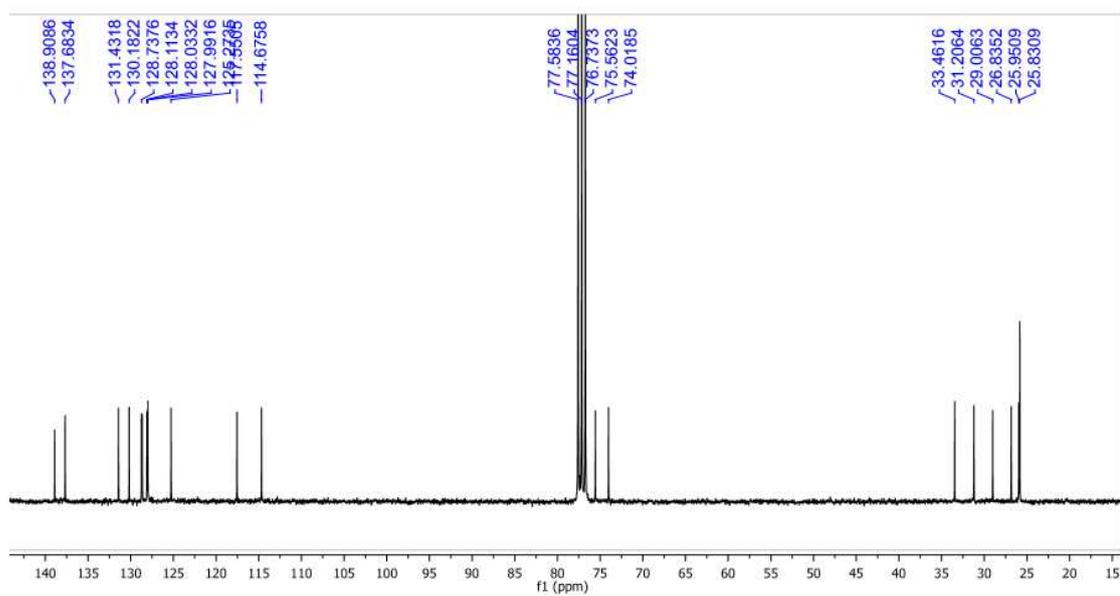
Scan AP+  
1.15e8

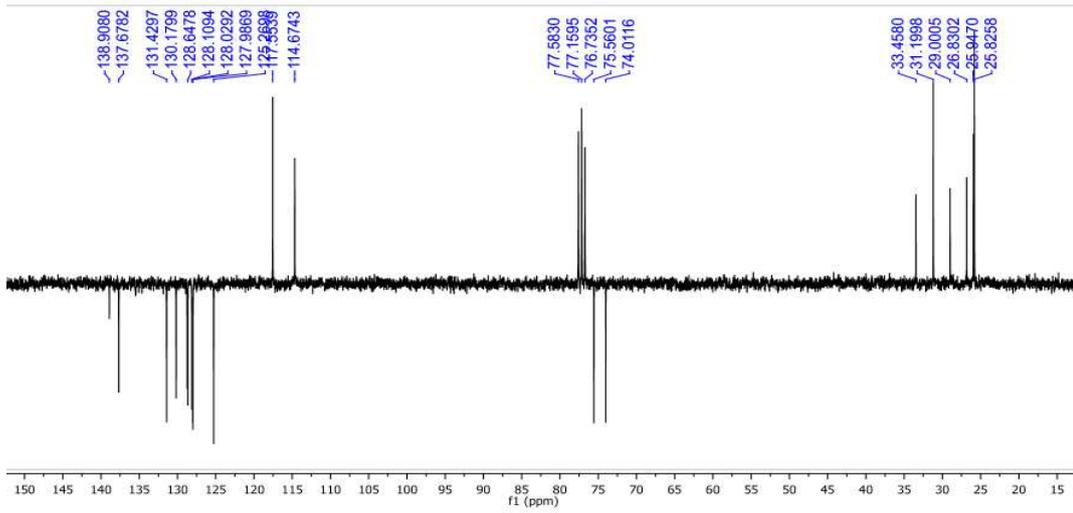
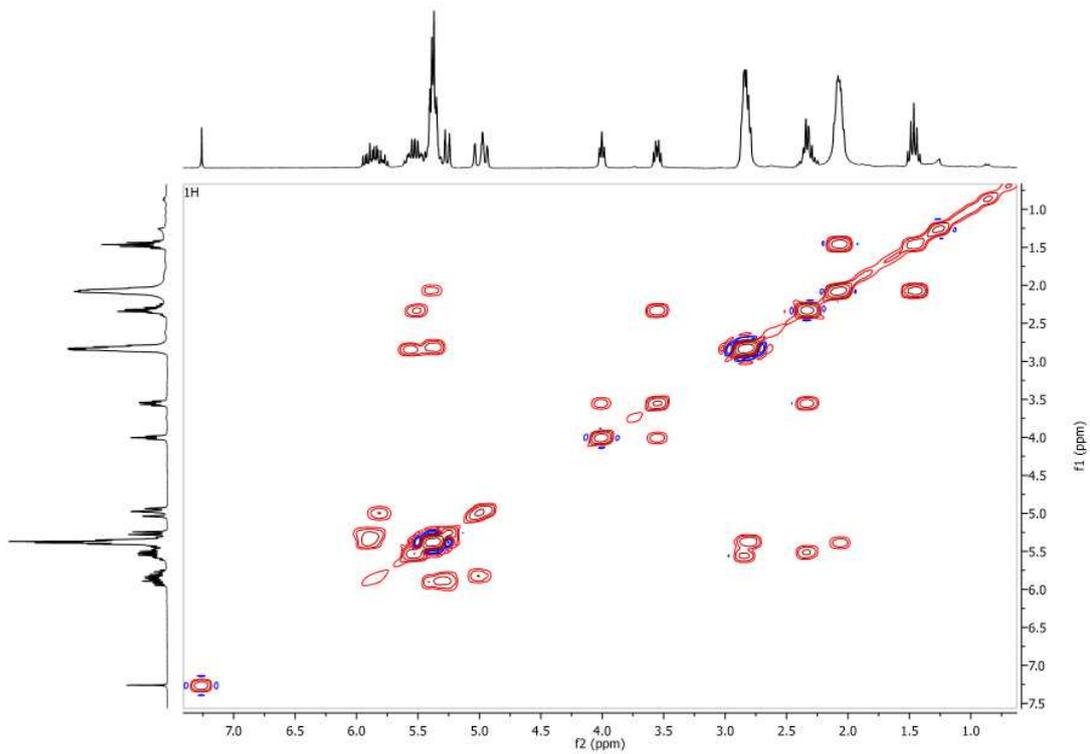
## APÊNDICE G – DADOS DE RMN $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-07

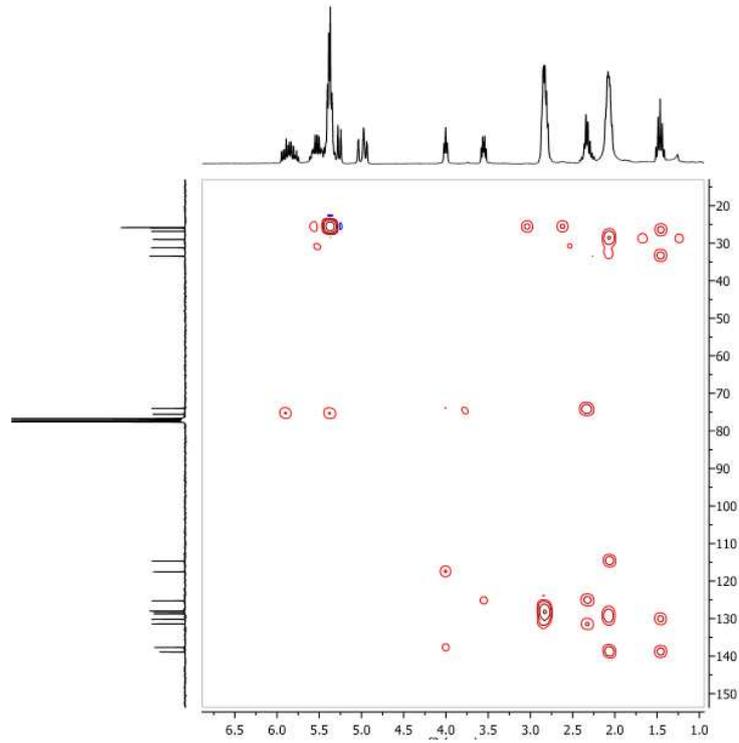
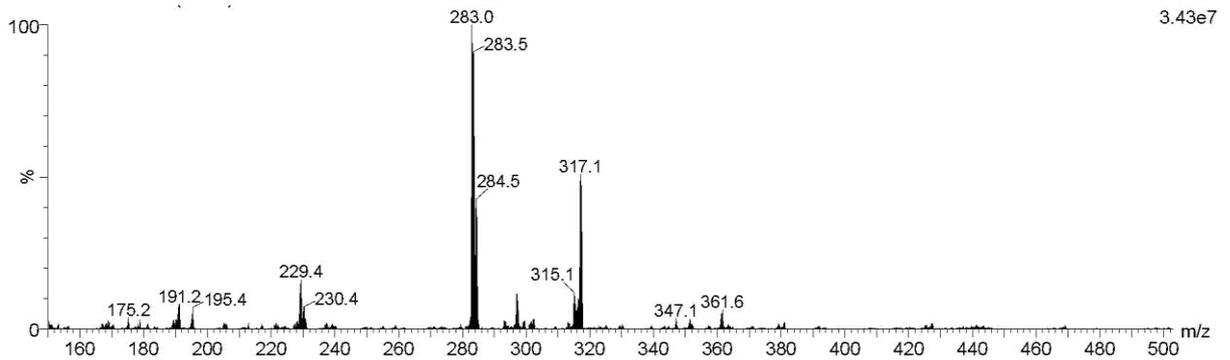
### G11: RMN $^1\text{H}$ LV-07



### G2: RMN $^{13}\text{C}$ LV-07

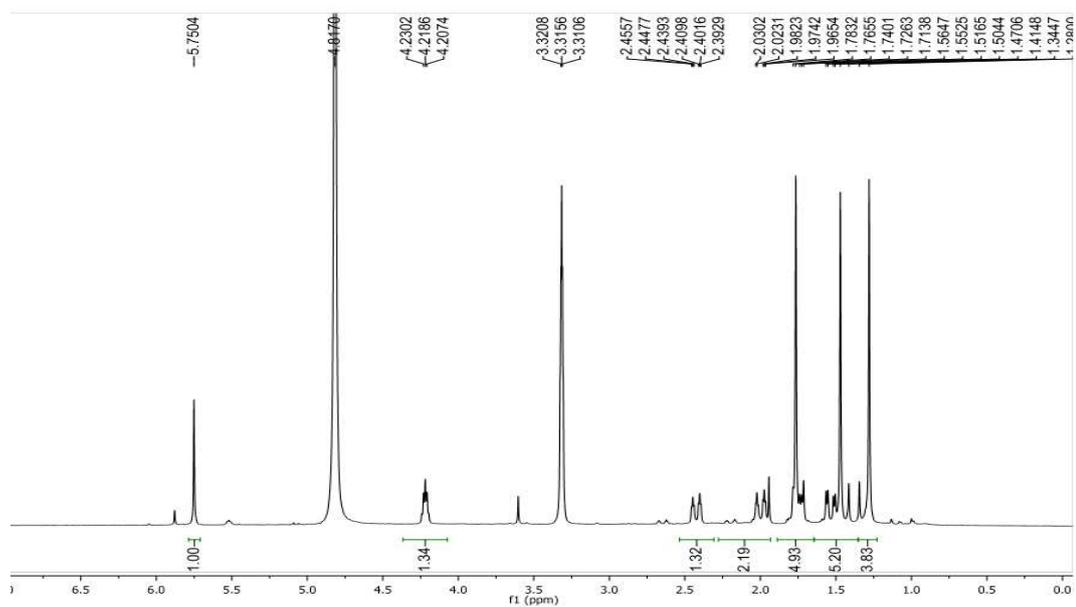


**G3: RMN  $^{13}\text{C}$  APT LV-07****G4: RMN D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY LV-08**

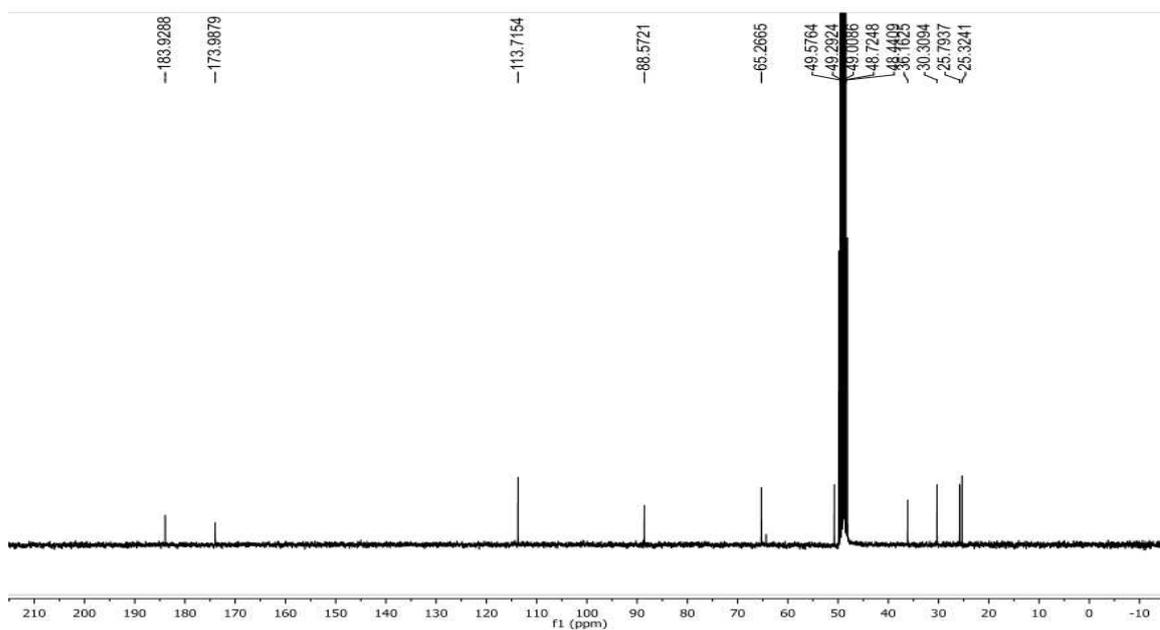
**G5: RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC LV-07****G6: ESPECTRO DE MASSAS DE LV-07 (EMAR-APCI)**

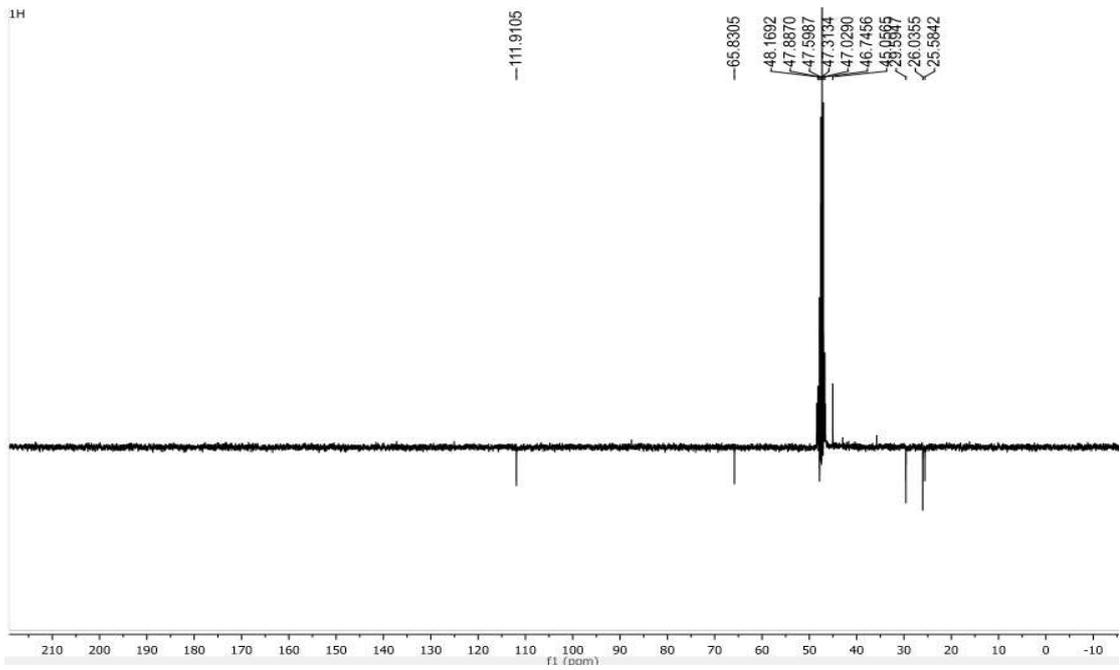
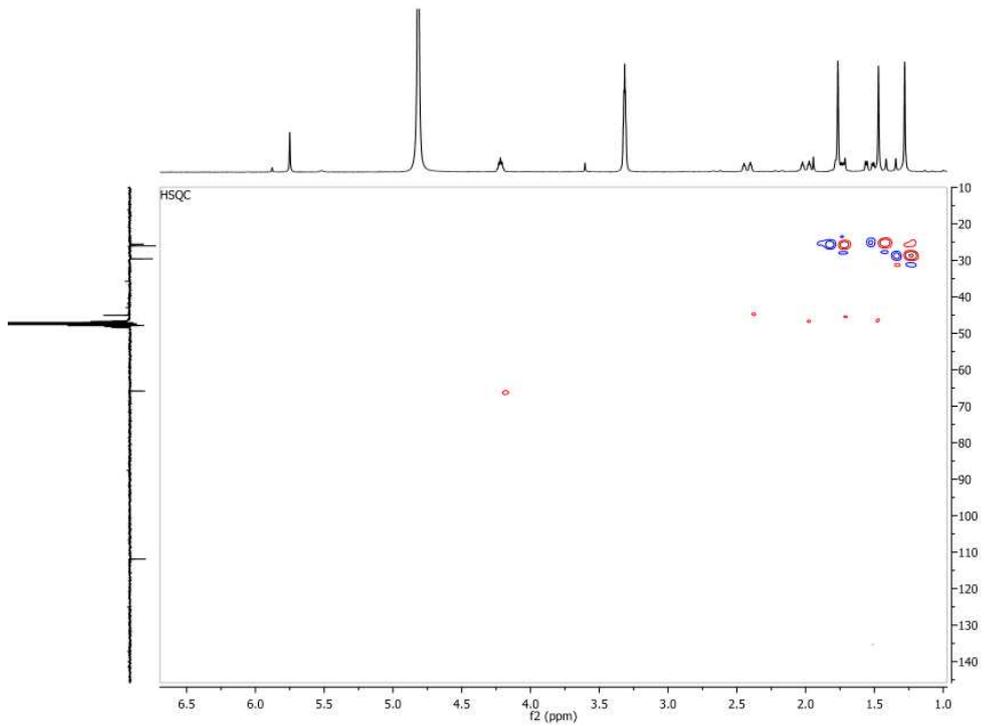
# APÊNDICE H – DADOS DE RMN $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE LV-08

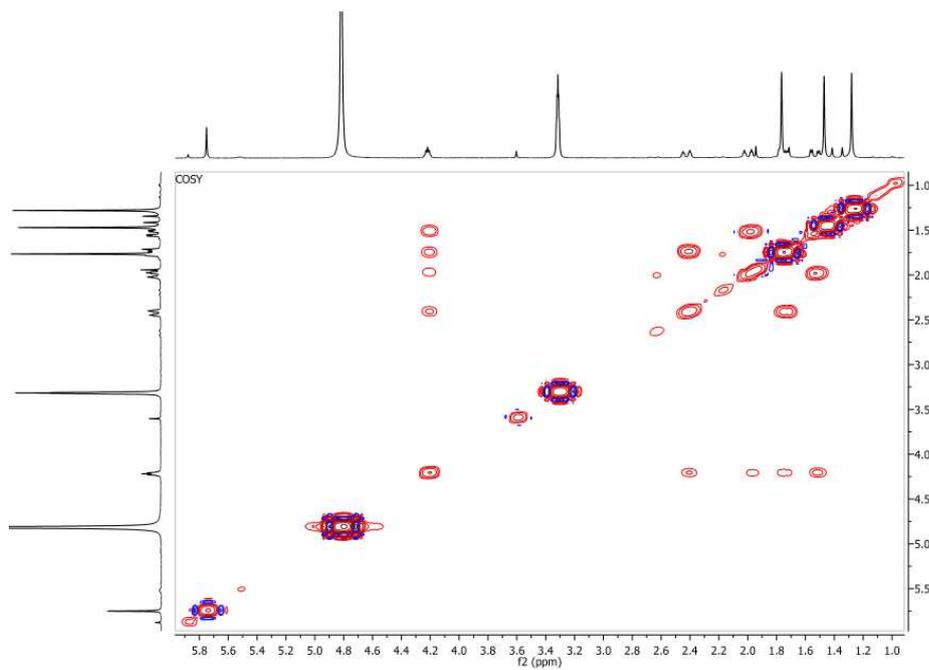
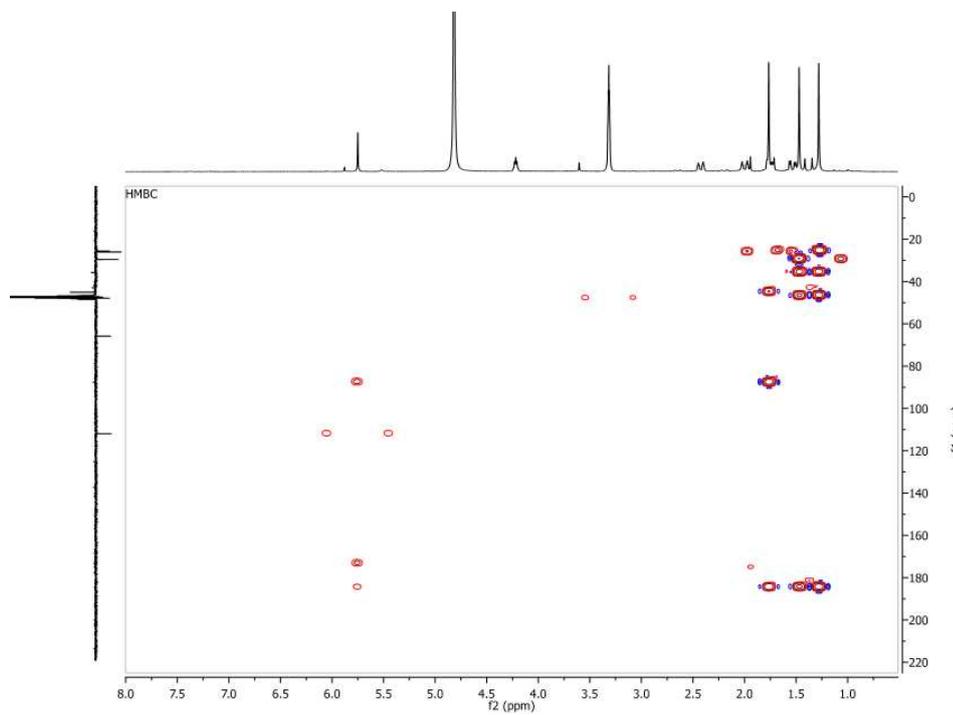
## H1: RMN $^1\text{H}$ LV-08



## H2: RMN $^{13}\text{C}$ LV-08

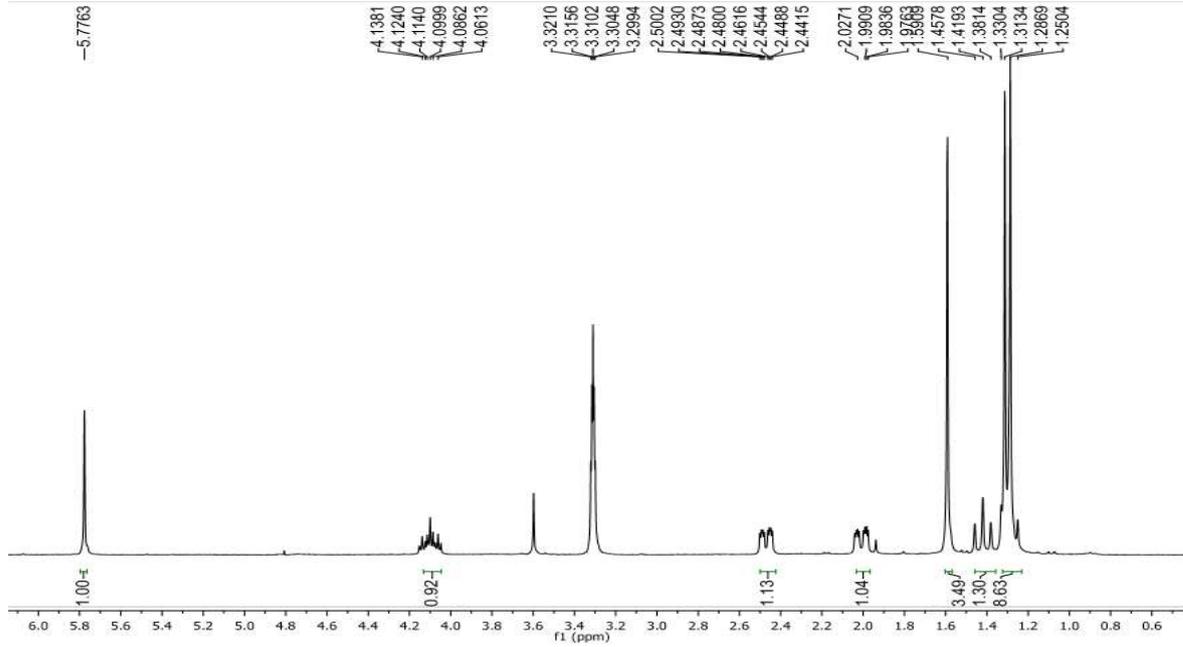


H3: RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 LV-08H4: RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC LV-08

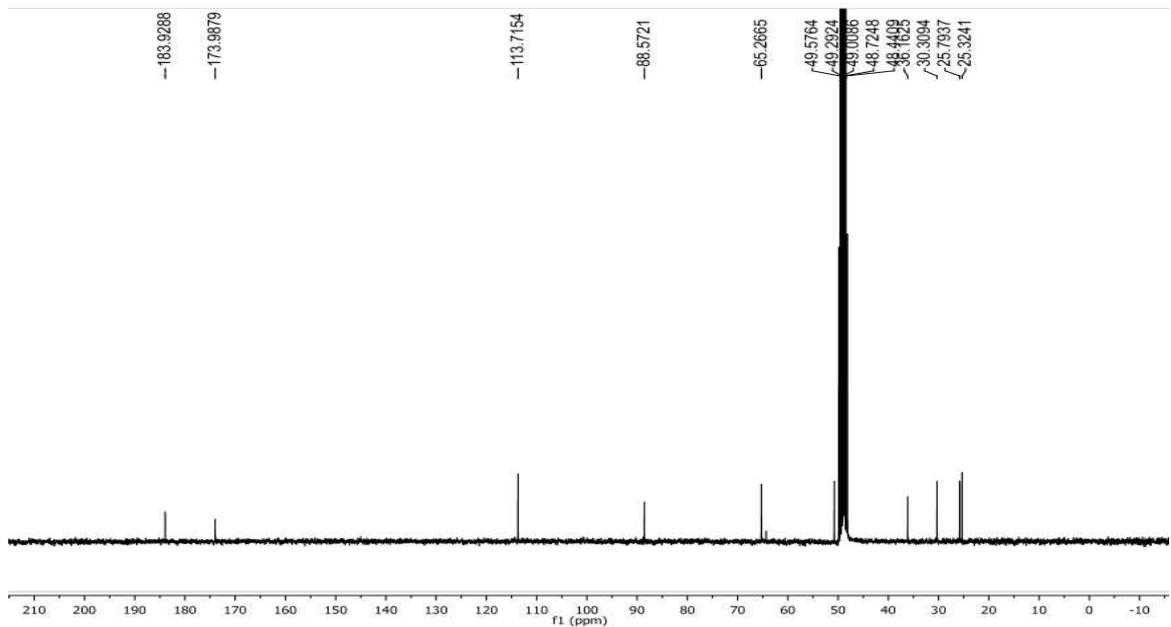
**H5: RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY LV-08****H6: RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC LV-08**

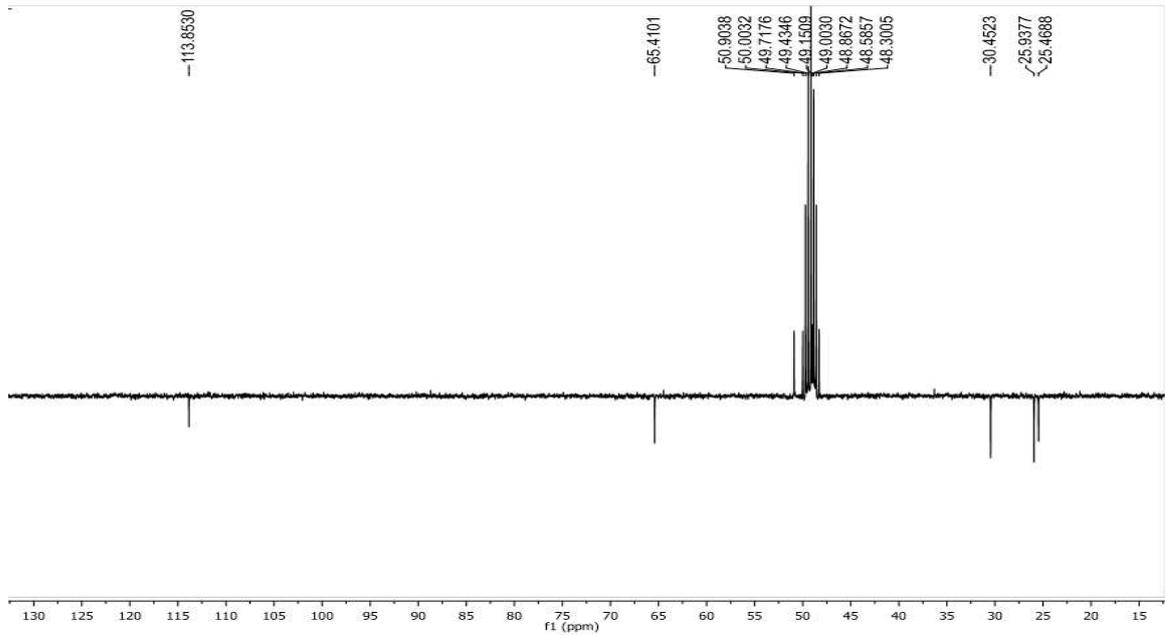
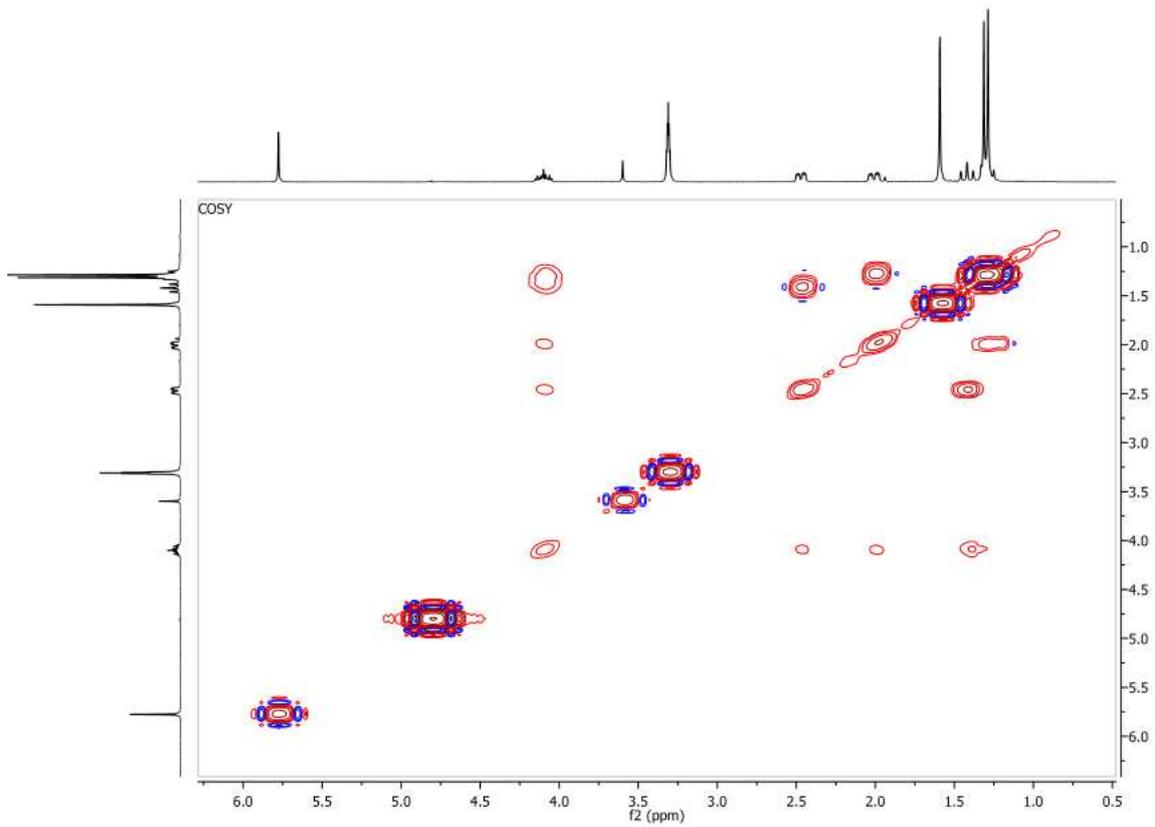
APÊNDICE I – DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  UNI E BIDIMENSIONAIS PARA  
ELUCIDAÇÃO DE LV-09

I1: RMN  $^1\text{H}$  LV-09

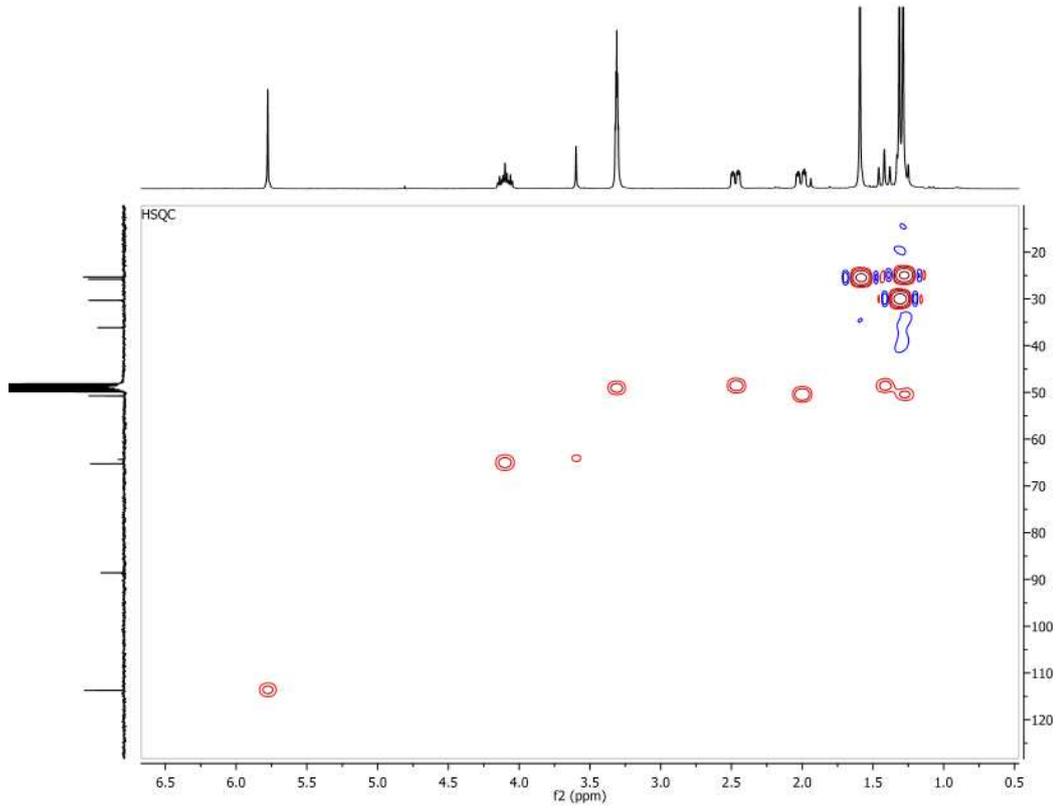


I2: RMN  $^{13}\text{C}$  LV-09



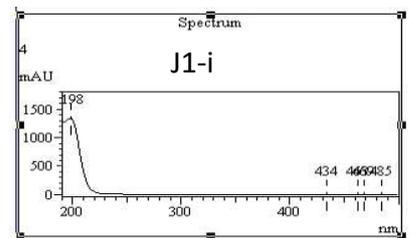
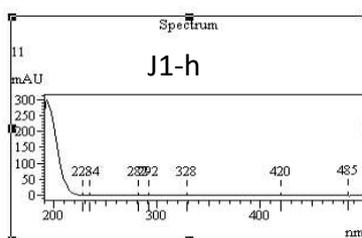
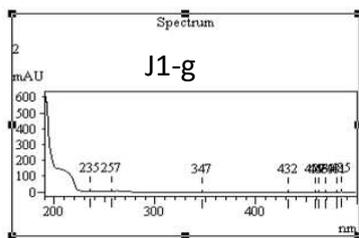
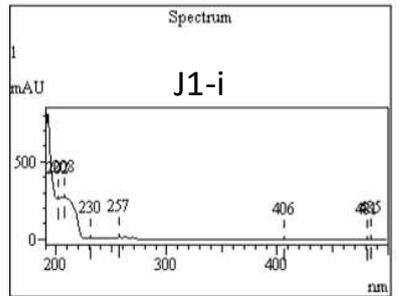
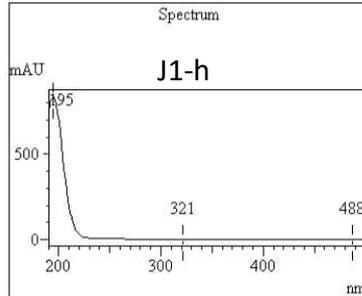
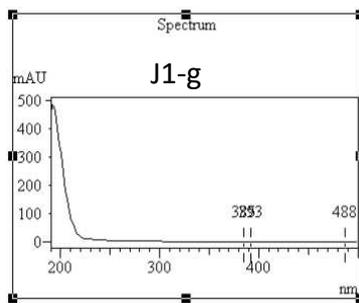
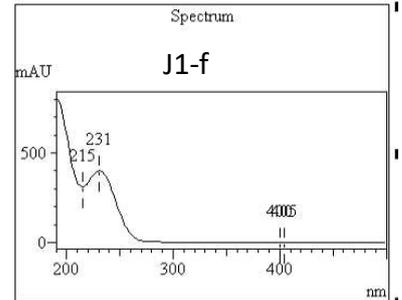
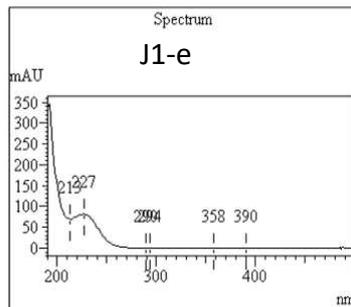
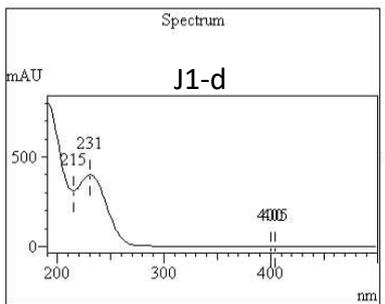
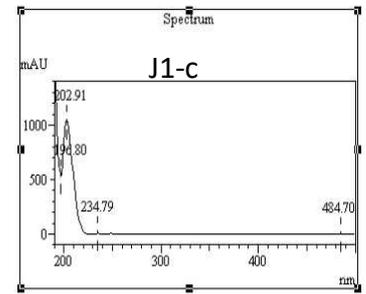
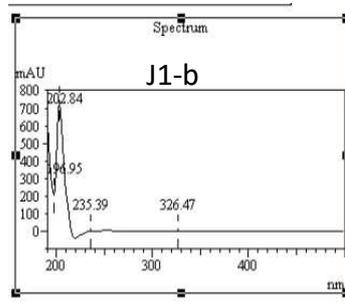
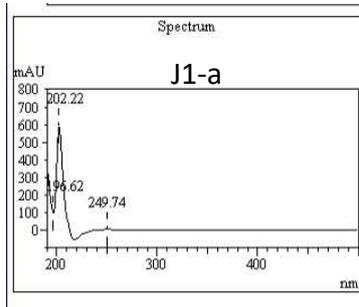
**I3: RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT 135 LV-09****I4: RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY LV-09**

I5: RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC LV-09

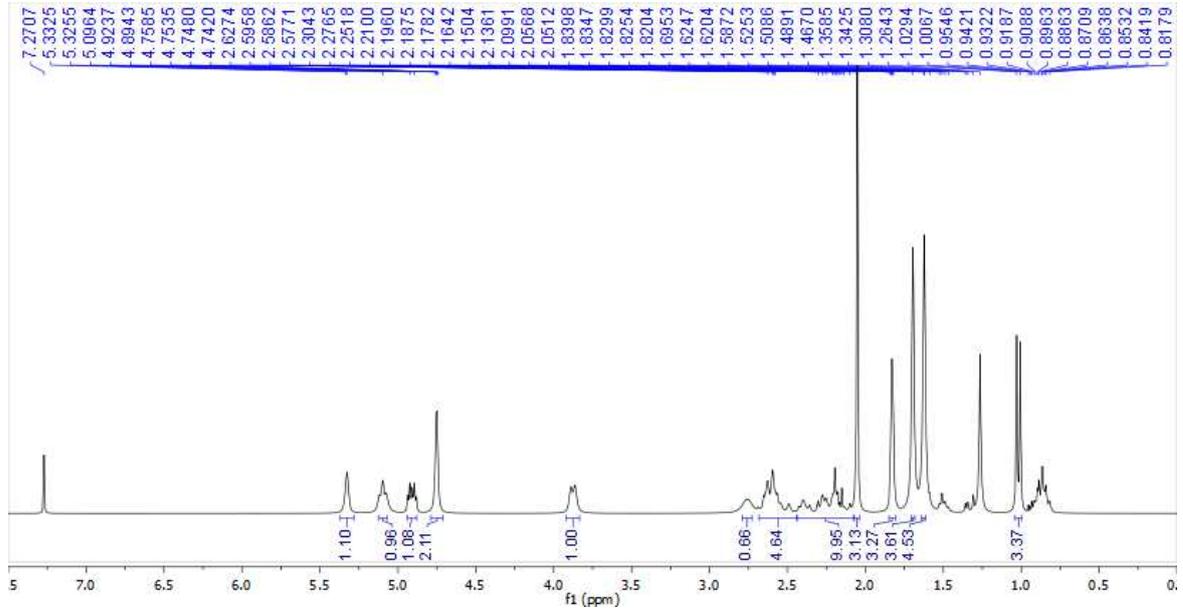


## APÊNDICE J – DADOS DE RMN $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-01

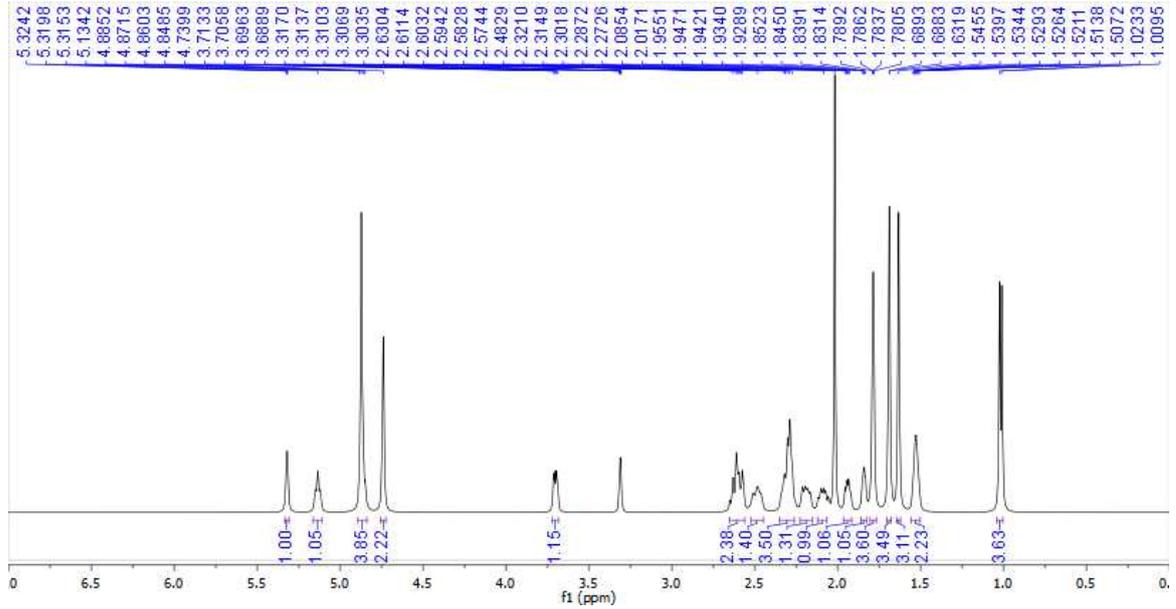
### J1- ESPECTROS DE UV



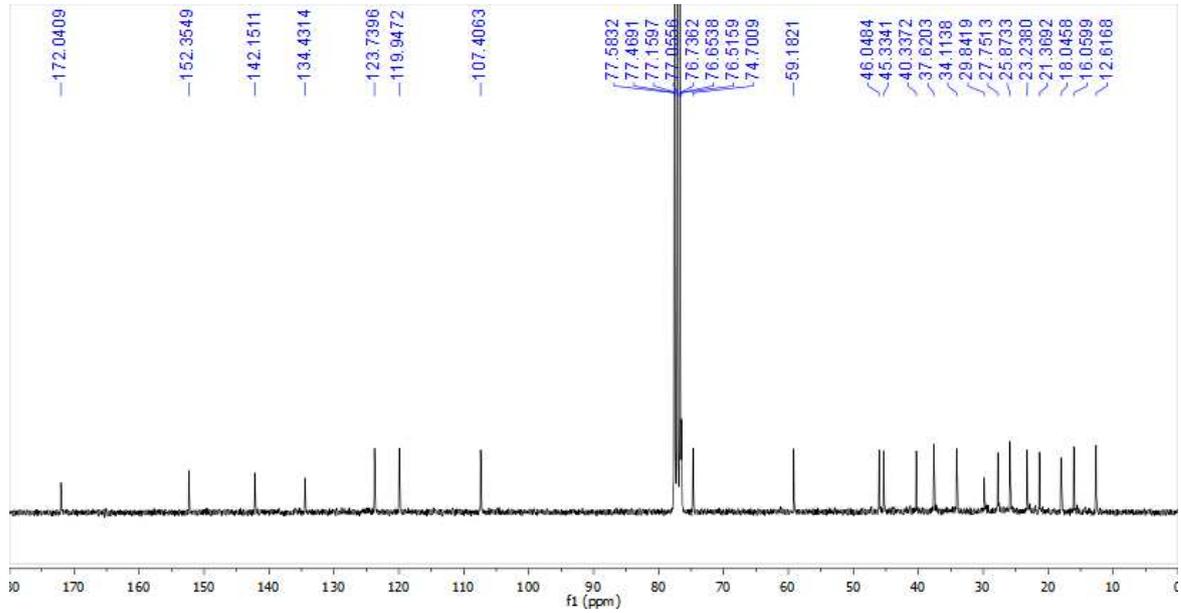
### J2- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H DE DM-01 (500 MHZ, CDCL<sub>3</sub>)



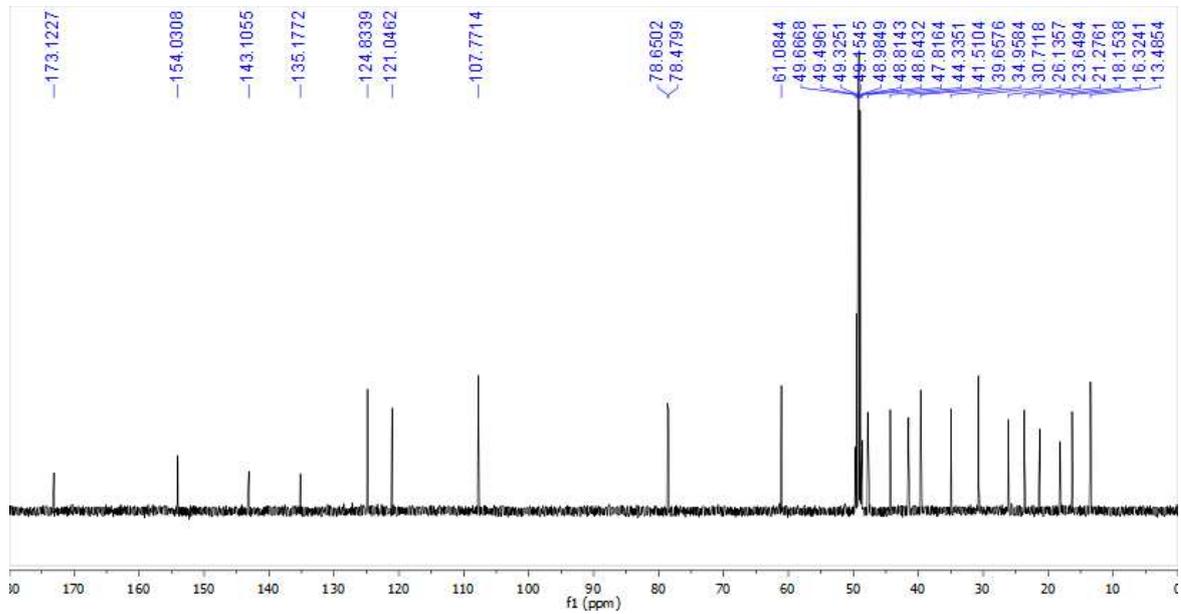
### J3- ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup>H DE DM-01 (500 MHZ, MEOD)



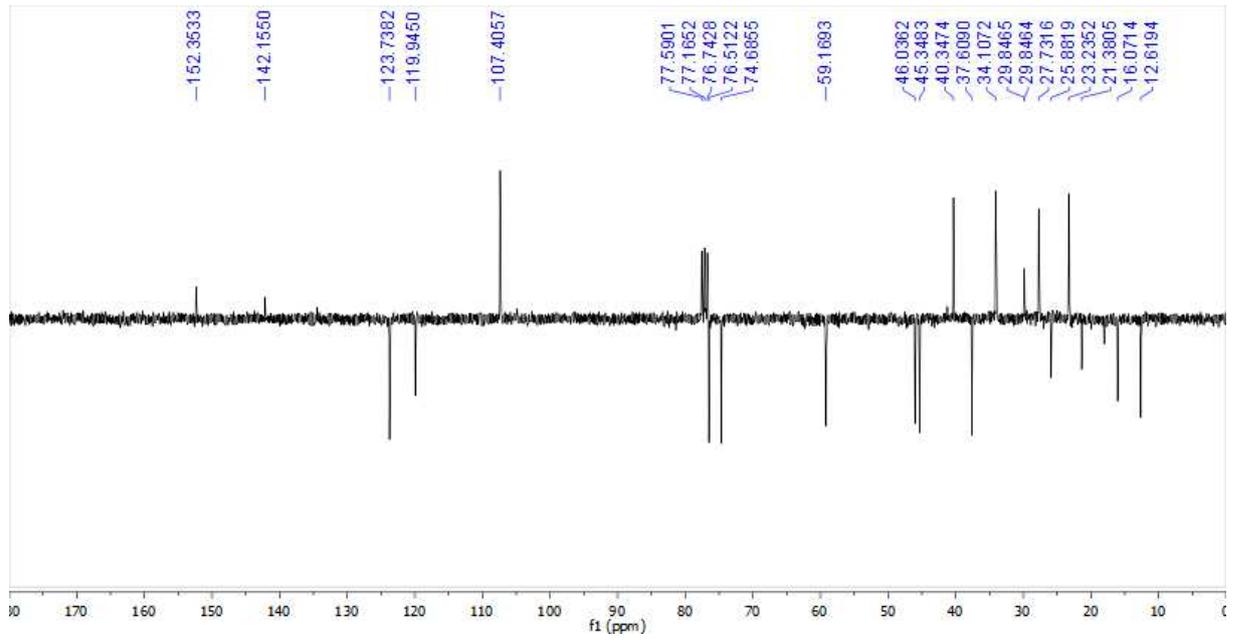
#### J4- ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ BB DE DM-01 (125 MHZ, $\text{CDCl}_3$ )



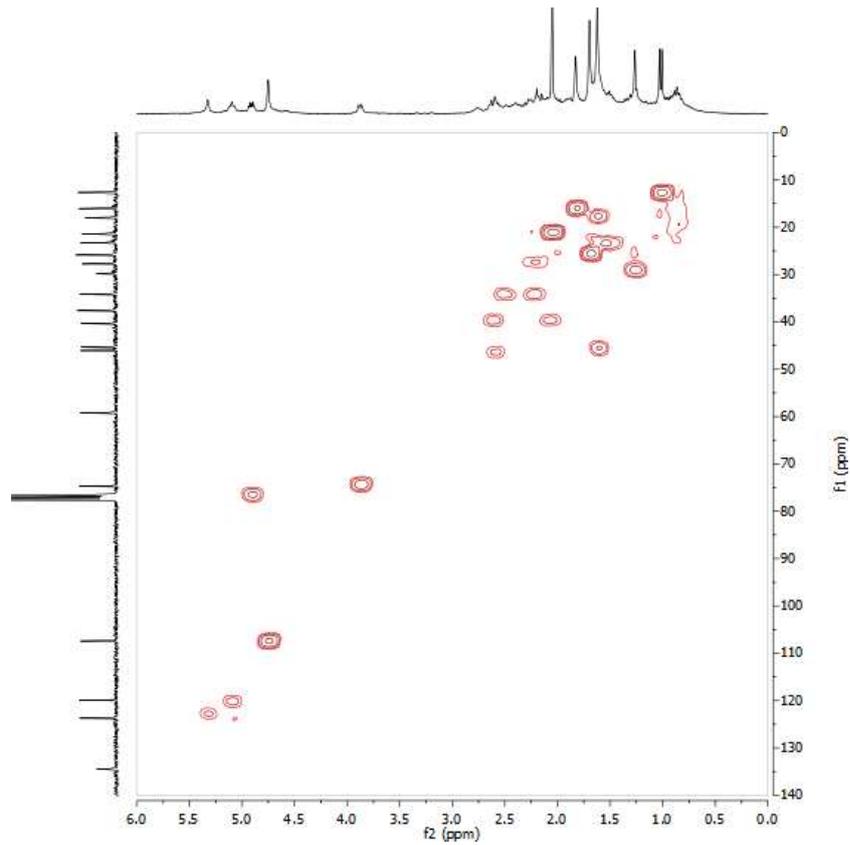
#### J5- ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ BB DE DM-01 (125 MHZ, MEOD)

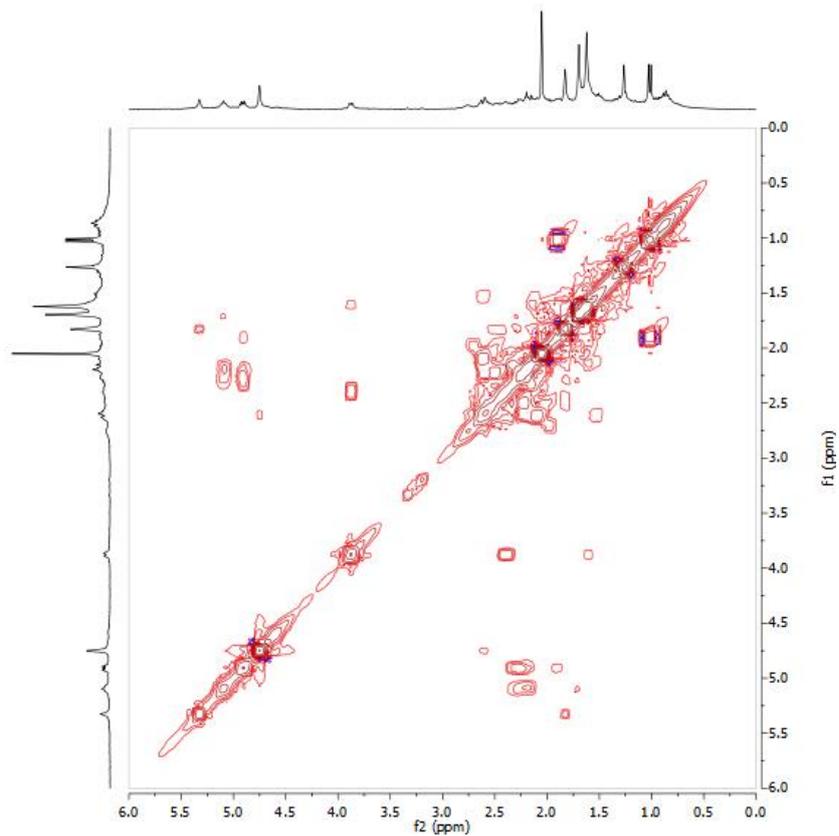
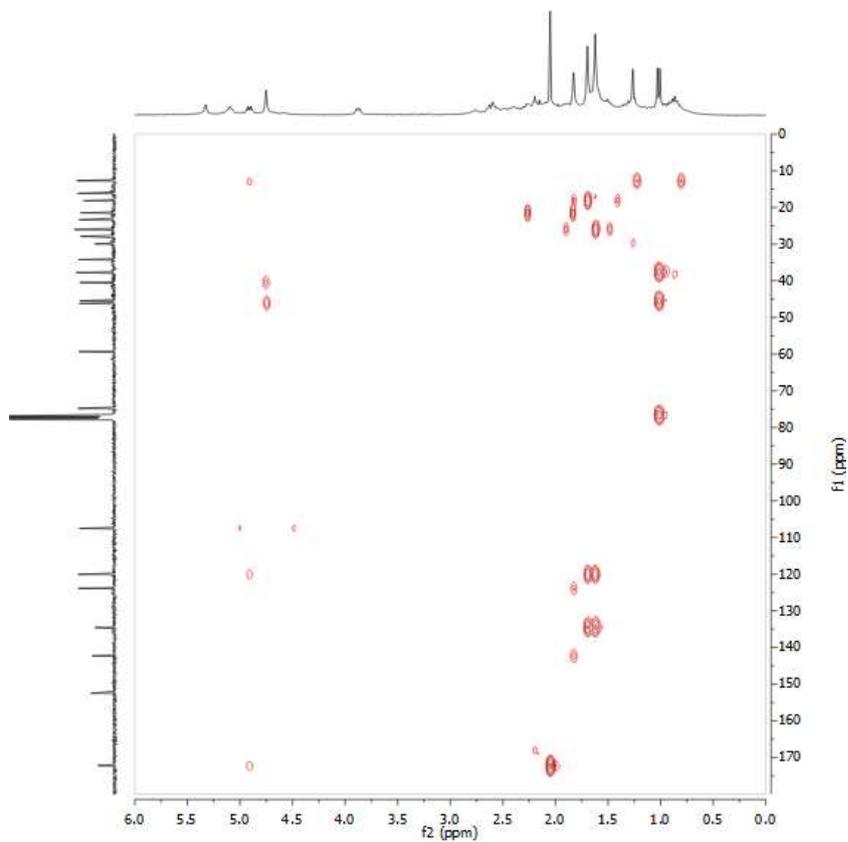


**J6- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  APT DE DM-01 (125 MHZ,  $\text{CDCl}_3$ )**

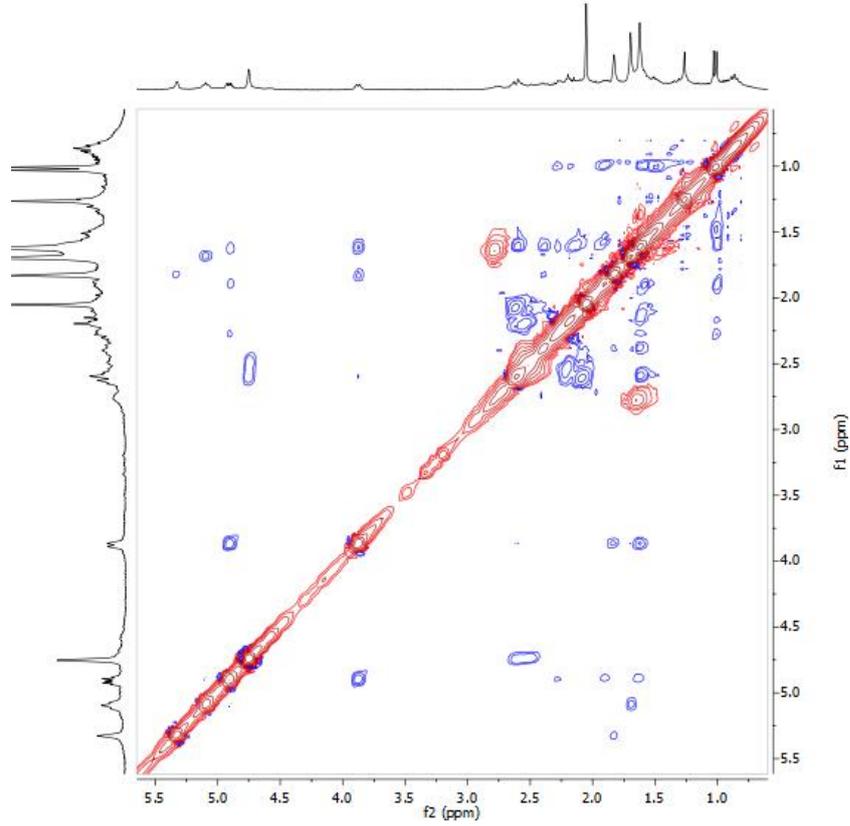


**J7- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC DE DM-01 ( $\text{CDCl}_3$ )**



**J8- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY DE DM-01 ( $\text{CDCl}_3$ )****J9 - ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE DM-01 ( $\text{CDCl}_3$ )**

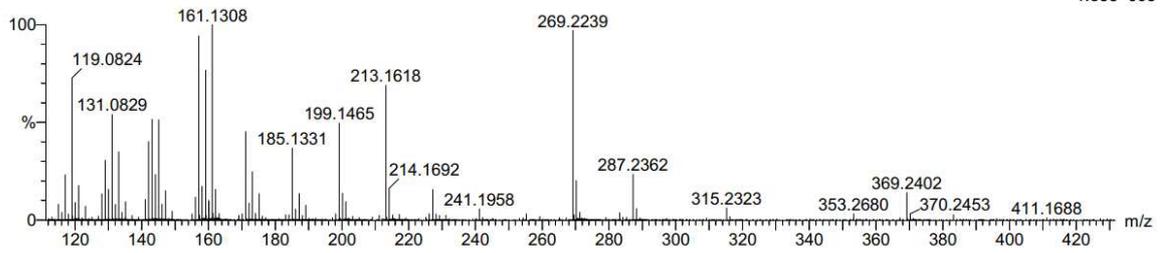
**J10 - ESPECTRO DE RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NOESY DE DM-01 (CDCL<sub>3</sub>)**



**J11 - ESPECTRO DE EMAR-ESI DE DM-01**

UPLC-QToF\_1869 1517 (13.656)

1: TOF MS ES+  
1.63e+003

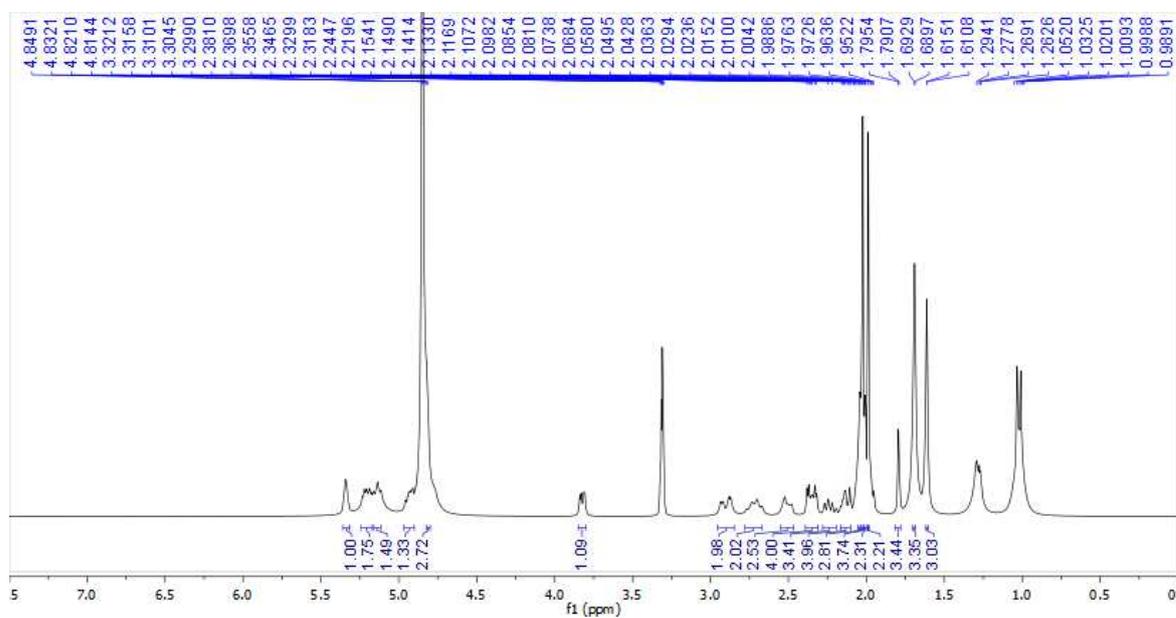


Minimum: -1.5  
Maximum: 5.0 40.0 50.0

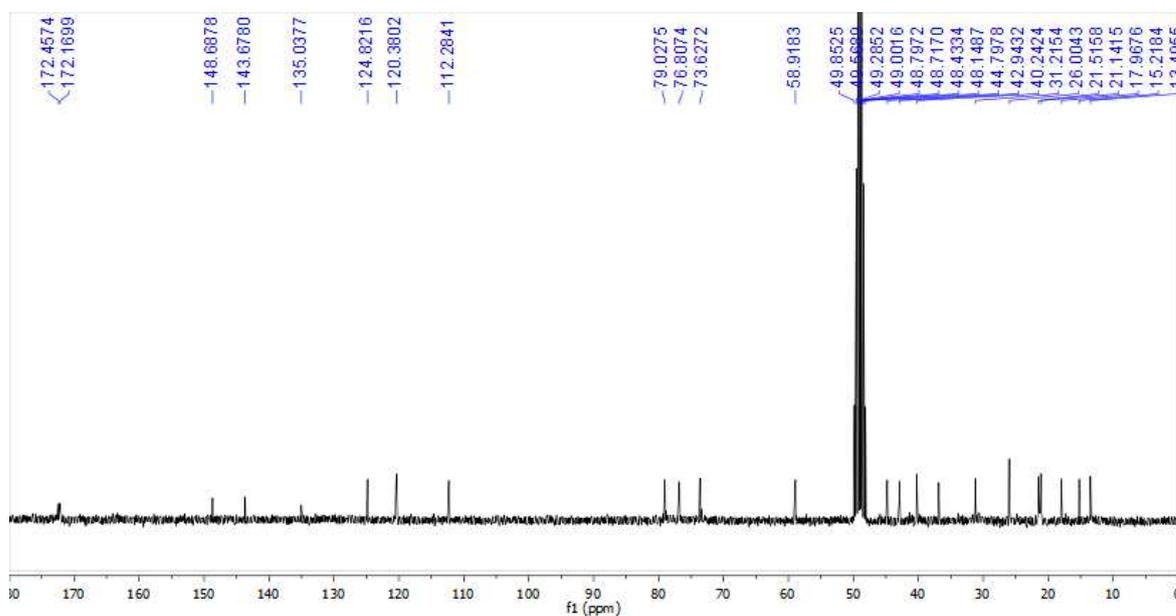
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
369.2402	369.2406	-0.4	-1.1	5.5	49.9	0.8	C22 H34 O3 Na
	369.2430	-2.8	-7.6	8.5	50.3	1.2	C24 H33 O3
	369.2488	-8.6	-23.3	-0.5	50.8	1.7	C17 H37 O8
	369.2277	12.5	33.9	4.5	51.8	2.7	C20 H33 O6

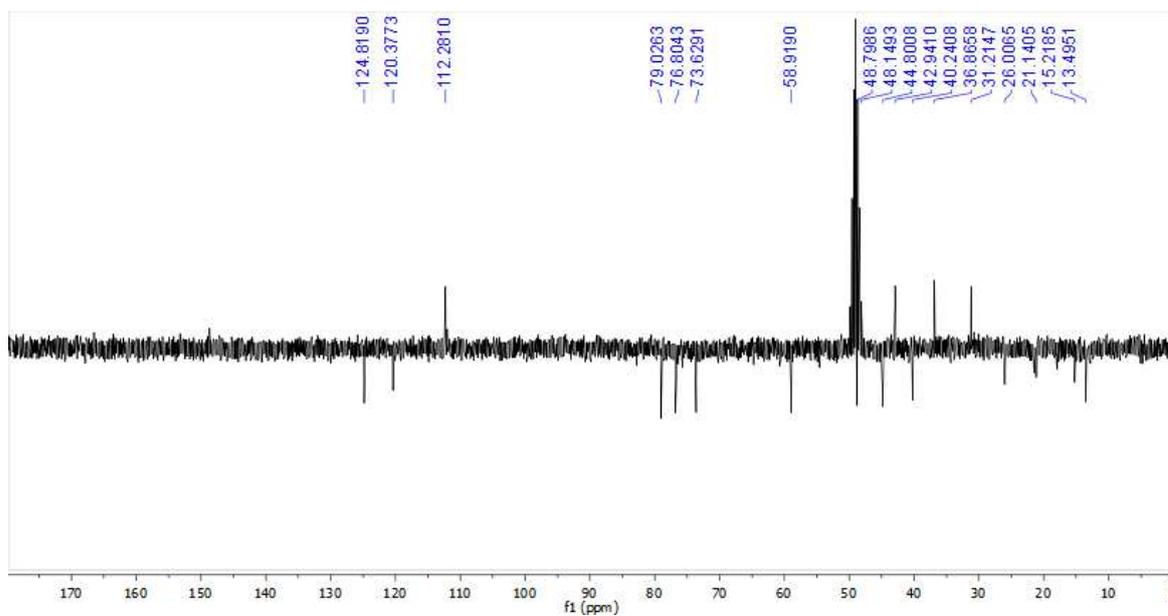
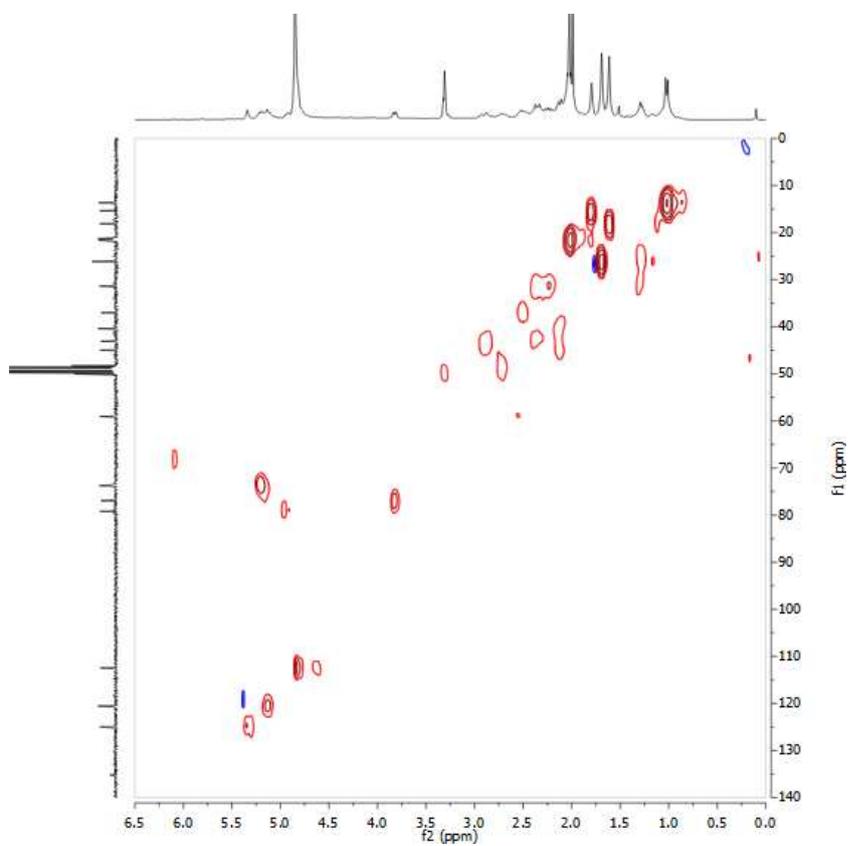
APÊNDICE K – DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  UNI E BIDIMENSIONAIS PARA  
ELUCIDAÇÃO DE DM-02

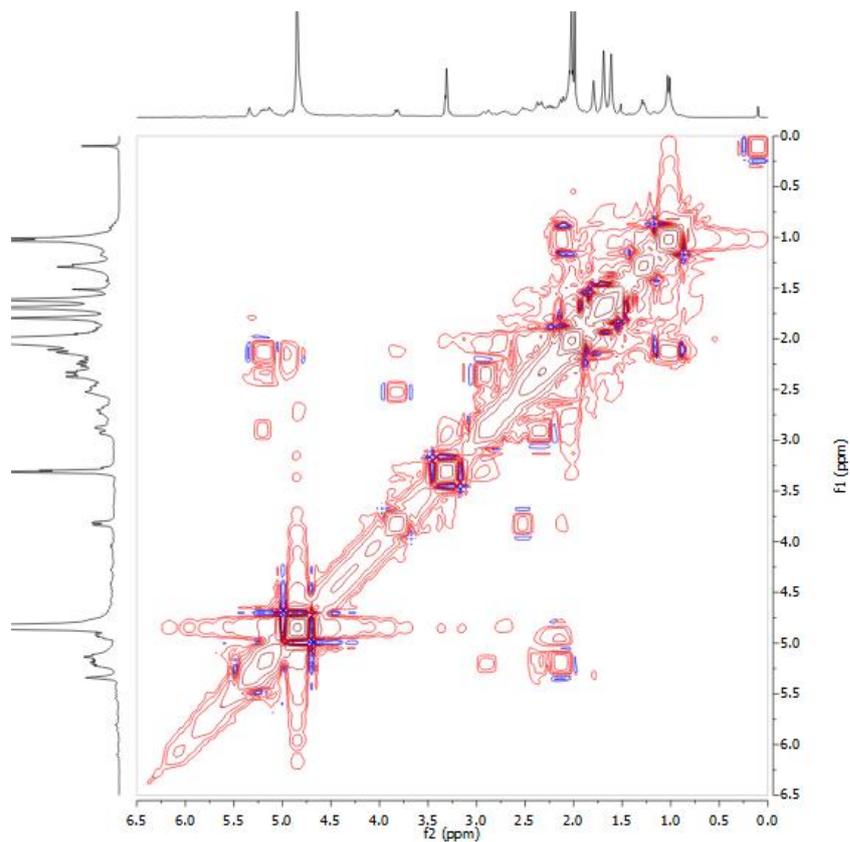
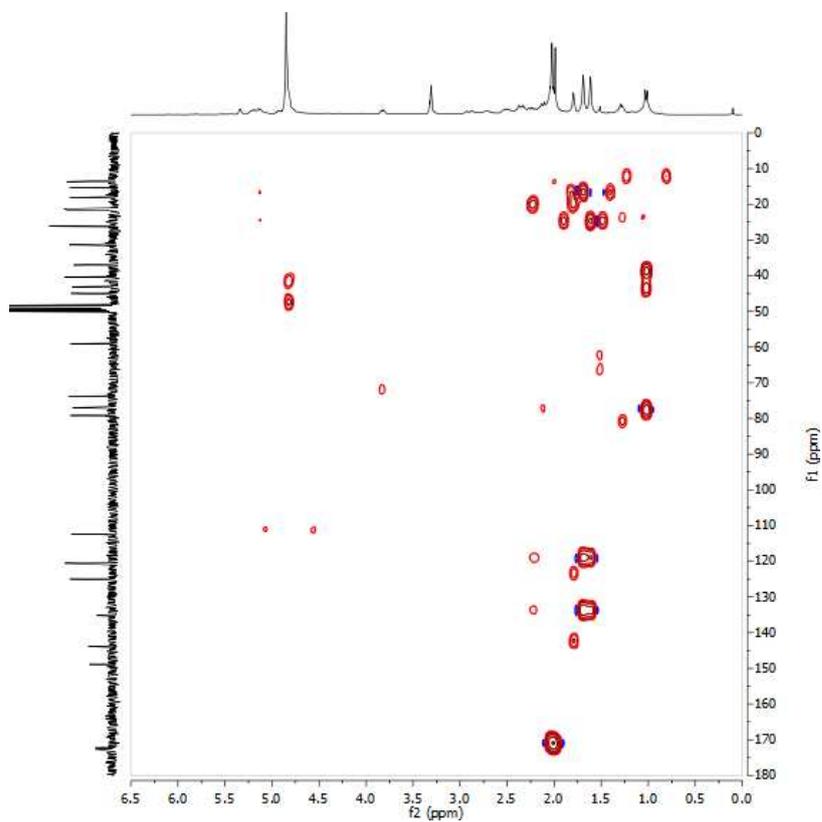
K1 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DE DM-02 (500 MHZ, MEOD)



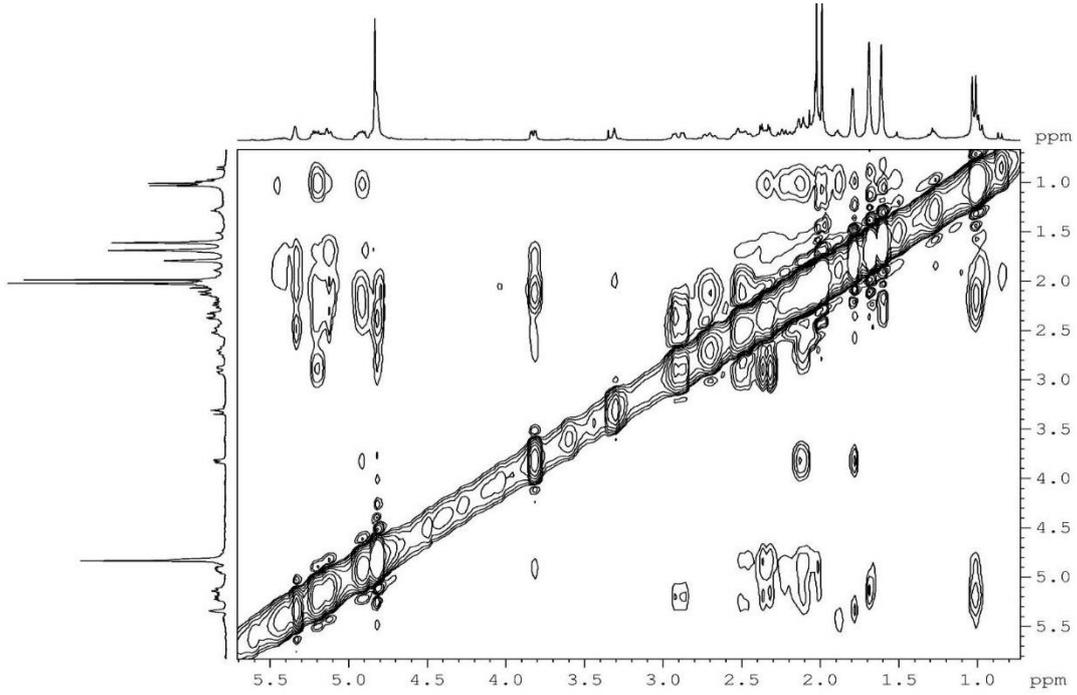
K2 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  BB DE DM-02 (125 MHZ, MEOD)



**K3 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  APT DE DM-02 (125 MHz, MEOD)****K4 - ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC DE DM-02 (MEOD)**

**K5 - ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY DE DM-02 (MEOD)****K6 - ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE DM-02 (MEOD)**

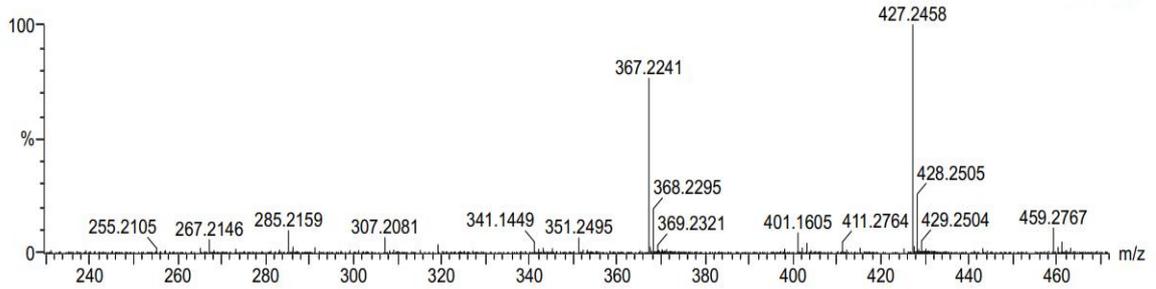
**K7 - ESPECTRO DE RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NOESY DE DM-02 (MEOD)**



**K8 - ESPECTRO DE EMAR-ESI DE DM-02**

UPLC-QToF\_5983 1176 (10.598)

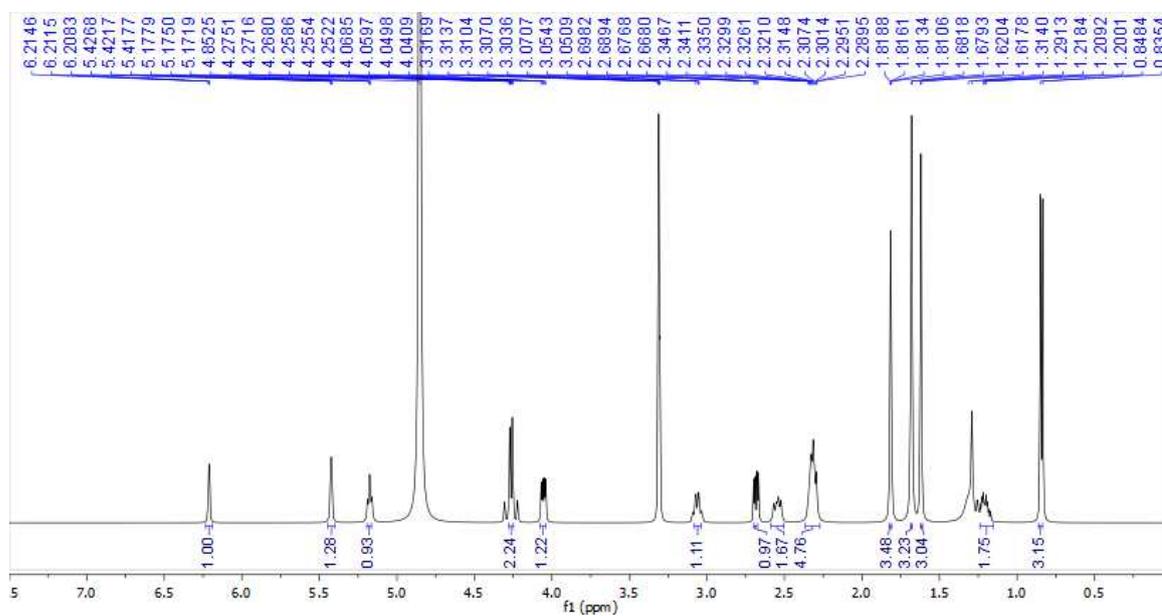
1: TOF MS ES+  
9.92e+002



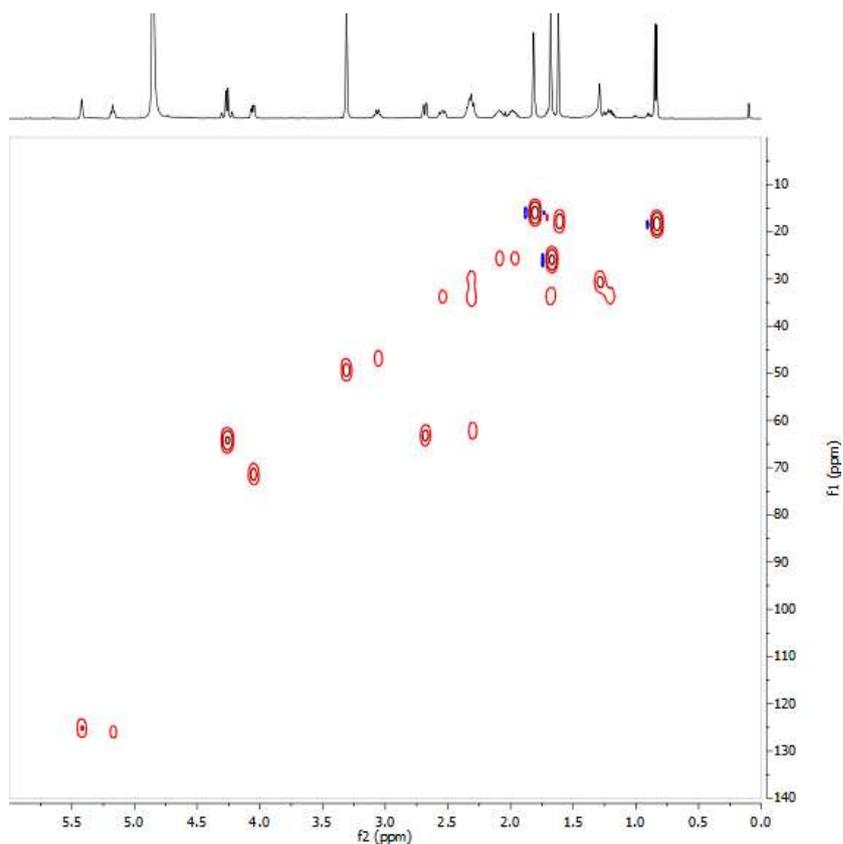
Minimum:								
Maximum:		10.0	10.0	-1.5				
				50.0				
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula	
427.2458	427.2460	-0.2	-0.5	6.5	54.9	0.0	C24 H36 O5 Na	

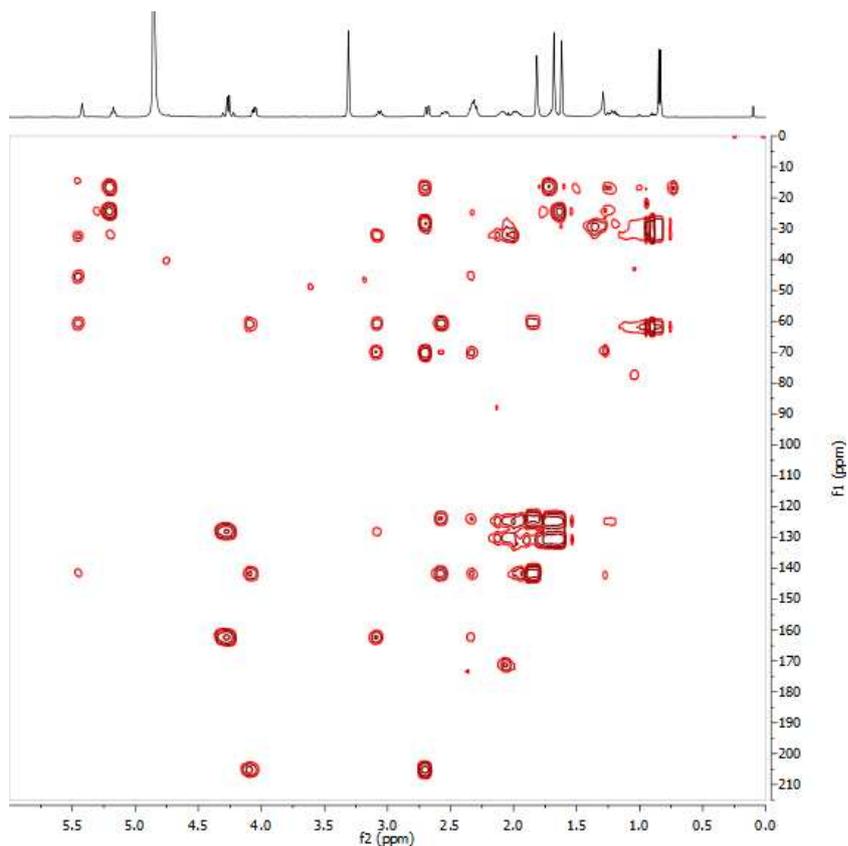
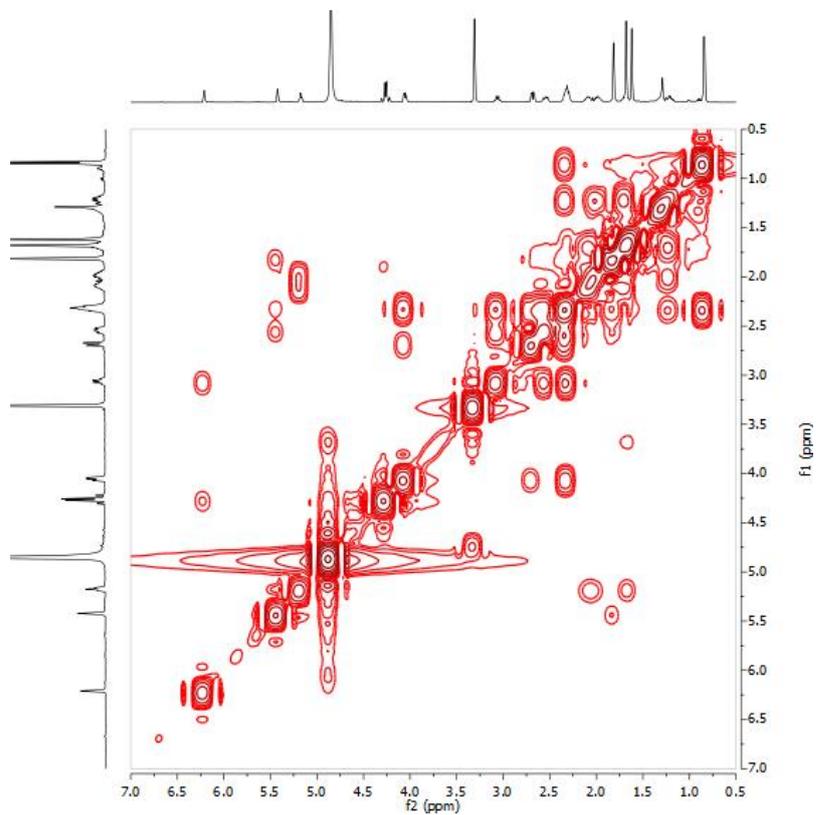
**APÊNDICE L – DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-03**

**L1- ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DE DM-03 (500 MHZ, MEOD)**

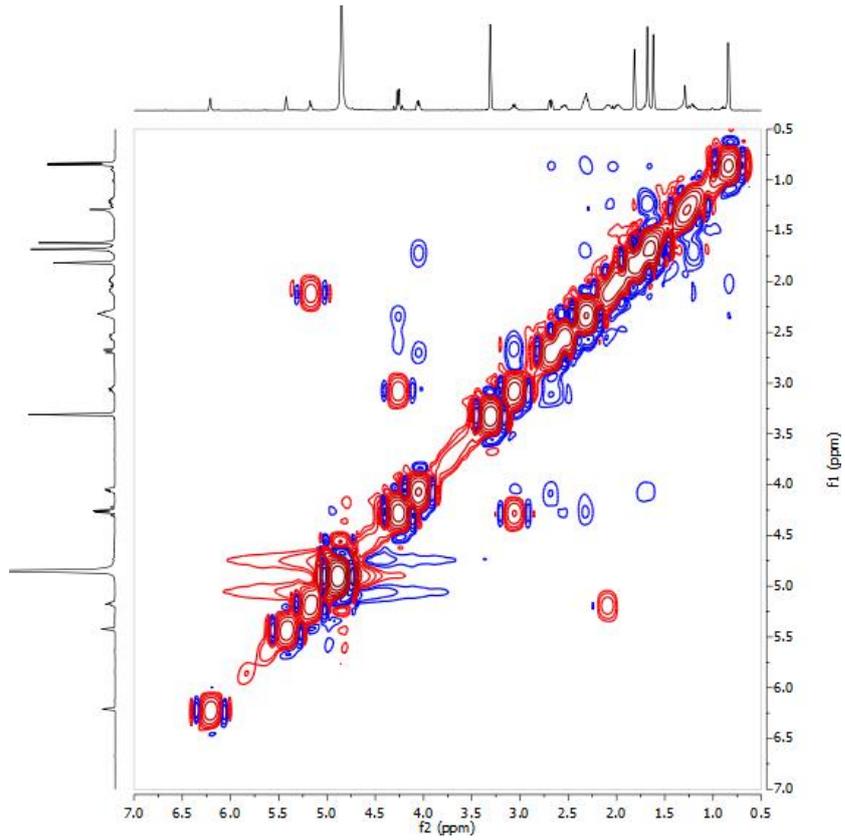


**L2- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC DE DM-03 (MEOD)**



**L3- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE DM-03 (MEOD)****L4- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY DE DM-03 (MEOD)**

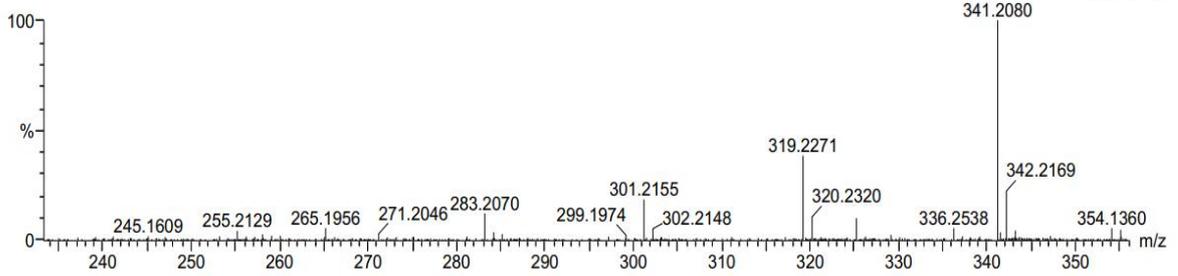
**L5- ESPECTRO DE RMN 2D <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C NOESY DE DM-03 (MEOD)**



**L6 - ESPECTRO DE EMAR-ESI DE DM-03**

UPLC-QToF\_5984 923 (8.312)

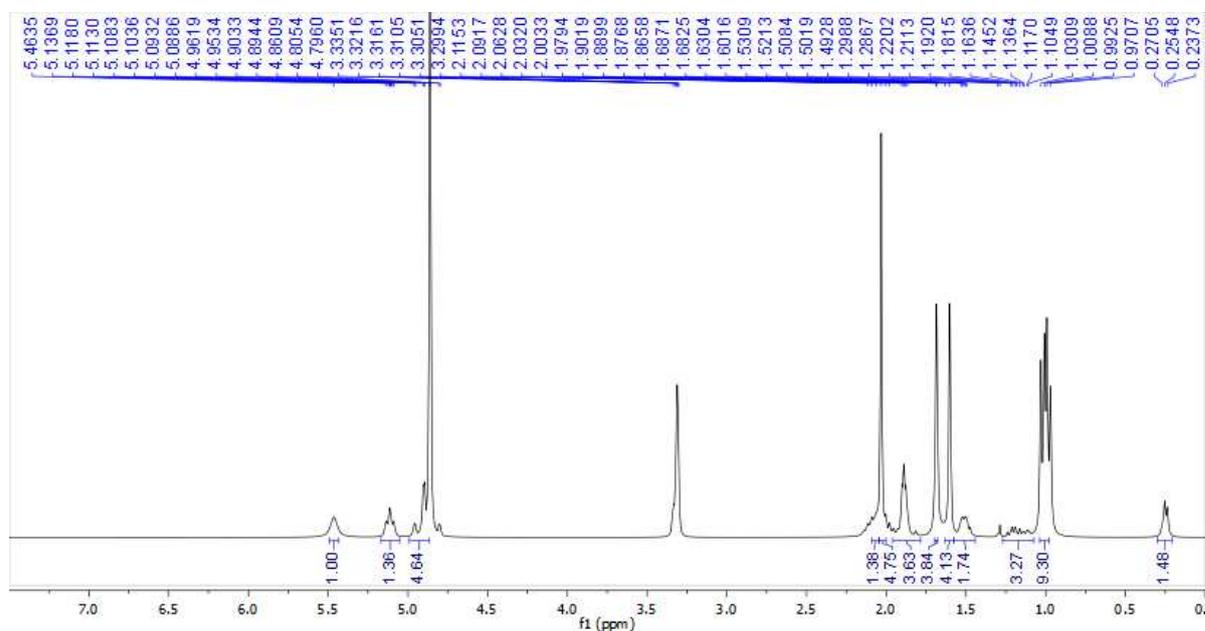
1: TOF MS ES+  
8.79e+002



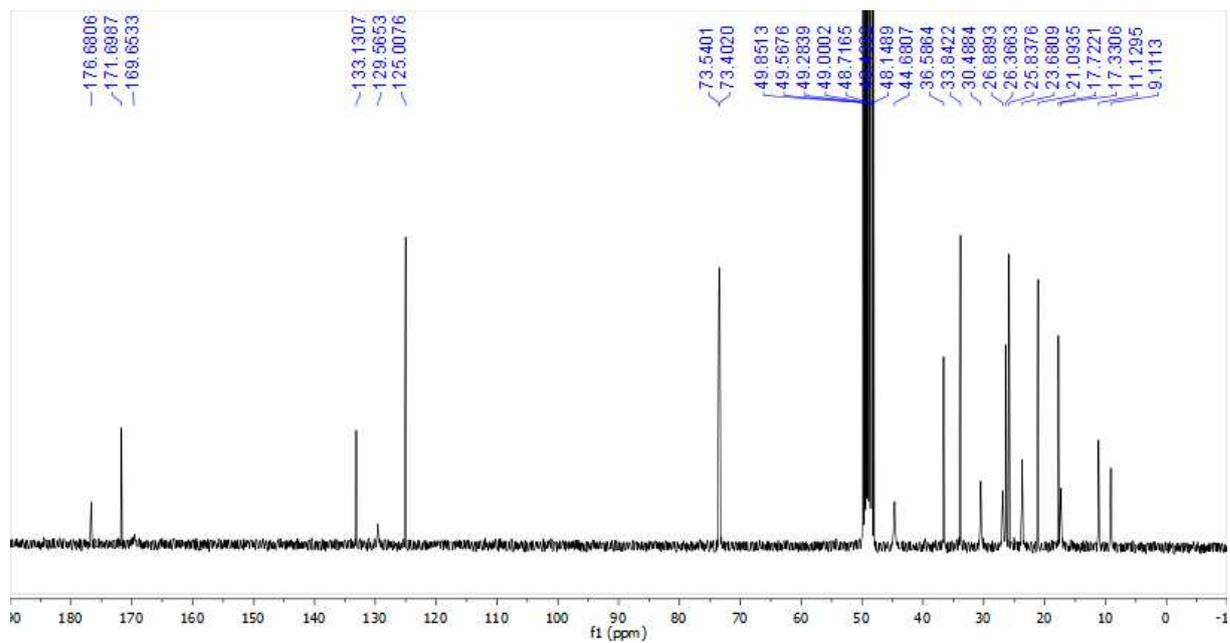
Minimum:								
Maximum:		10.0	10.0	-1.5				
				50.0				
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula	
319.2271	319.2273	-0.2	-0.6	5.5	47.0	0.0	C20	H31 O3

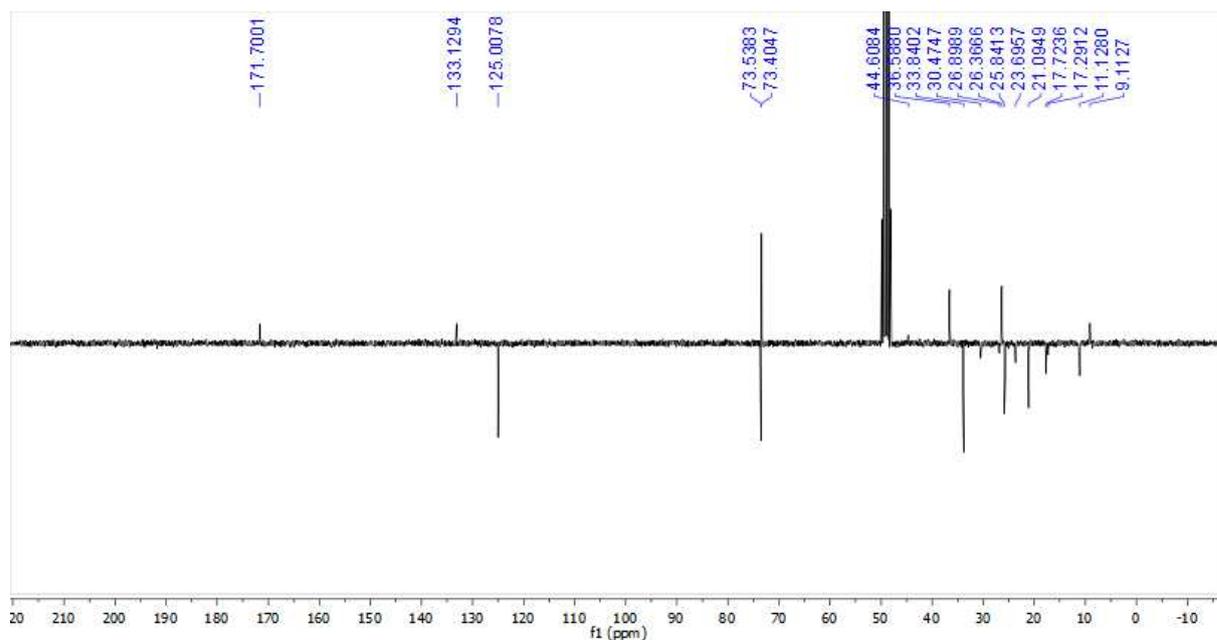
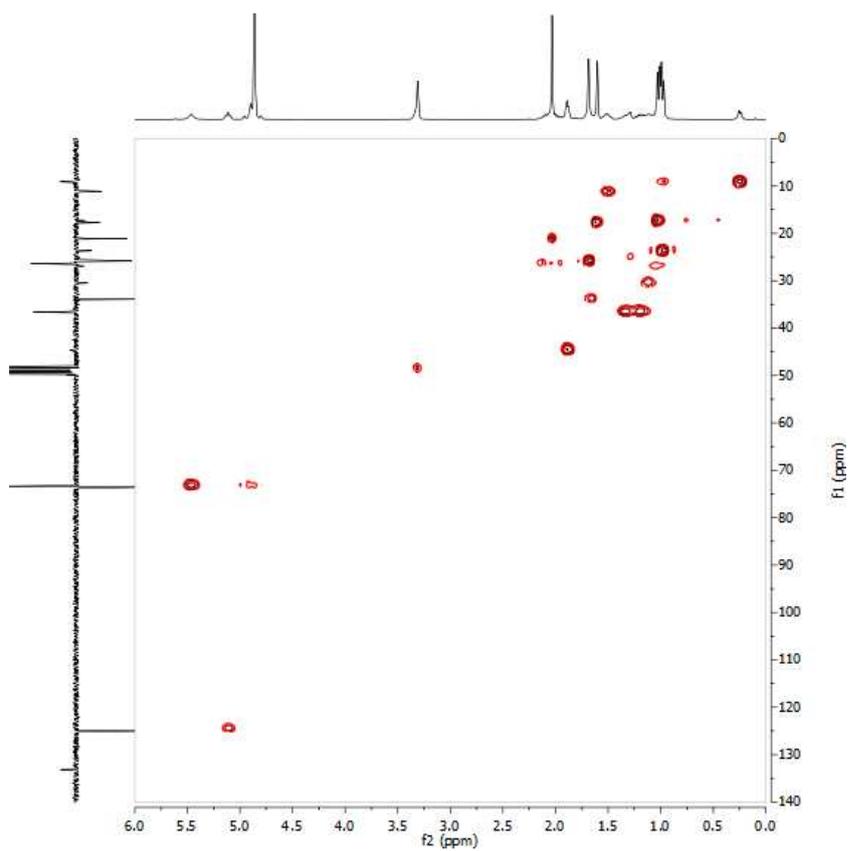
APÊNDICE M – DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  UNI E BIDIMENSIONAIS PARA  
ELUCIDAÇÃO DE DM-04

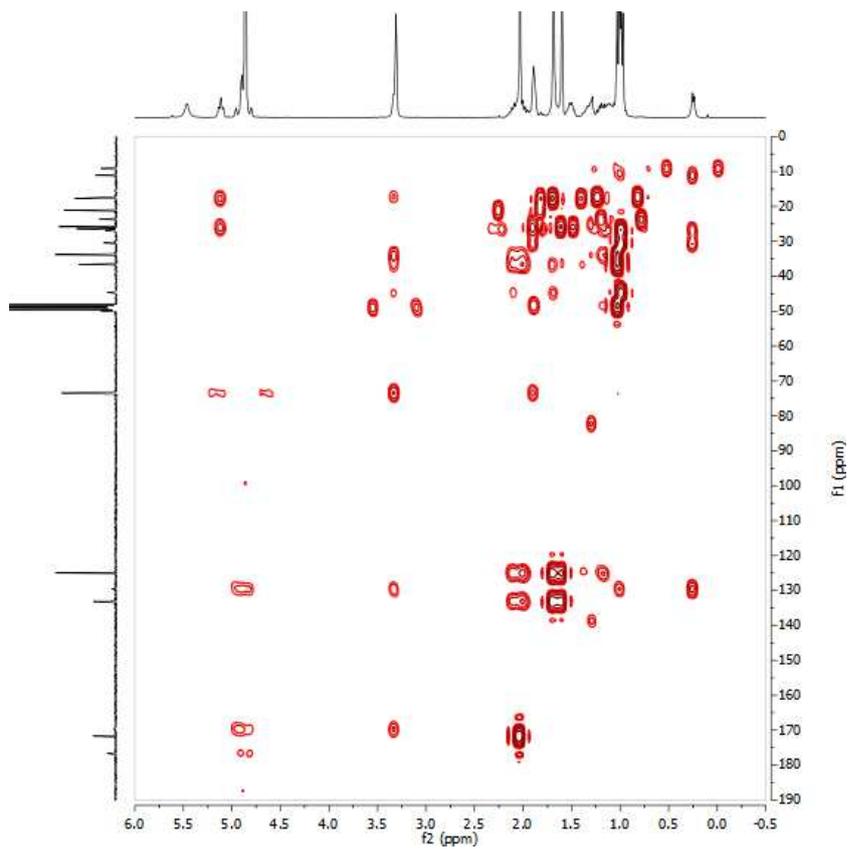
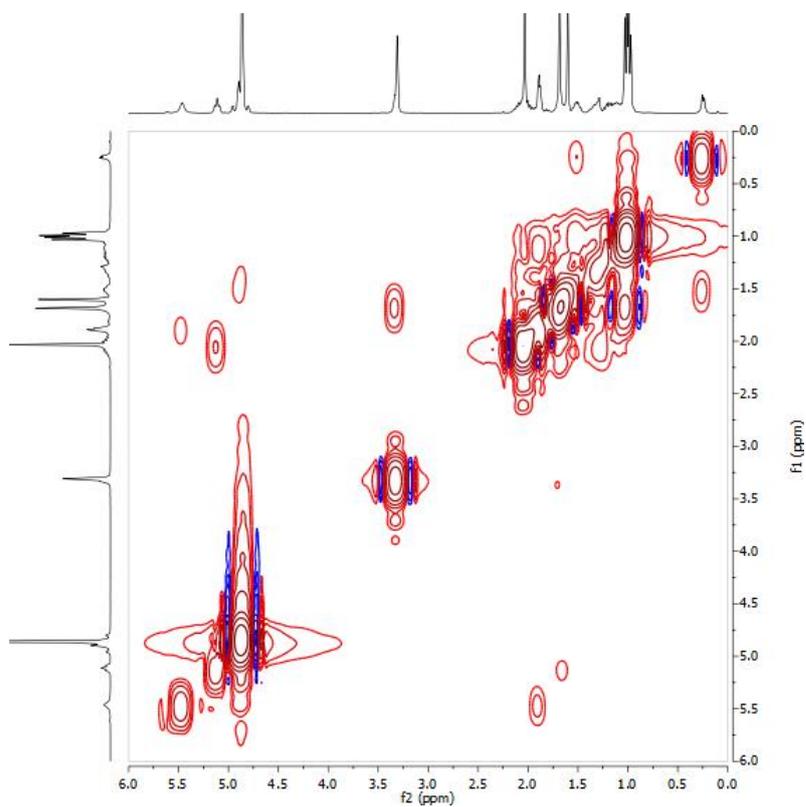
M1- ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DE DM-04 (300 MHZ, MEOD)

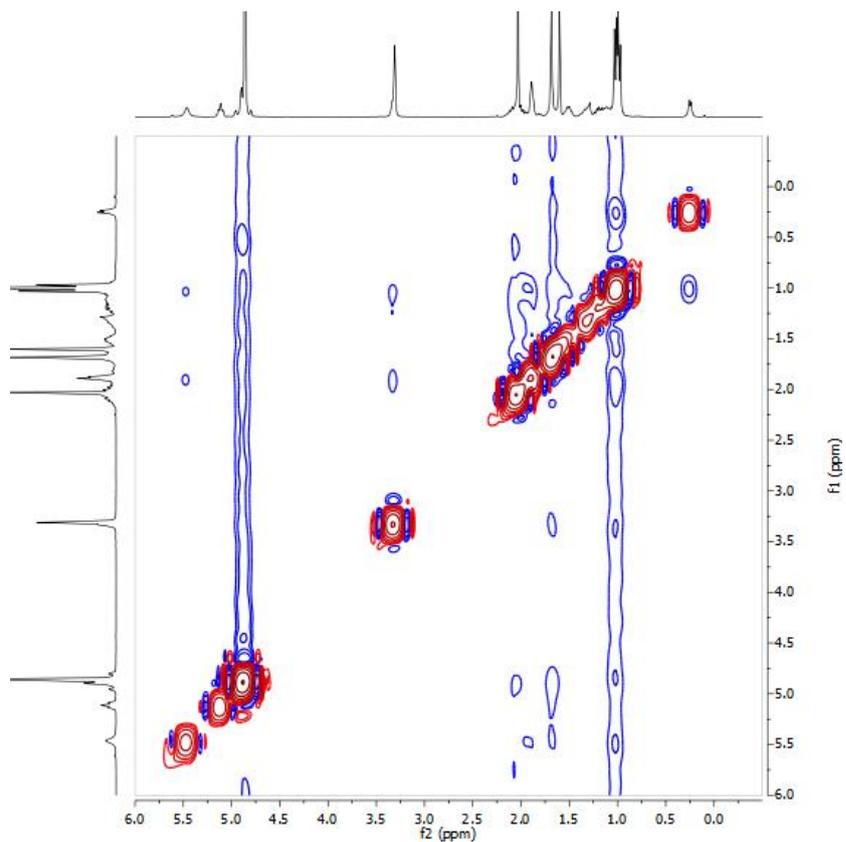
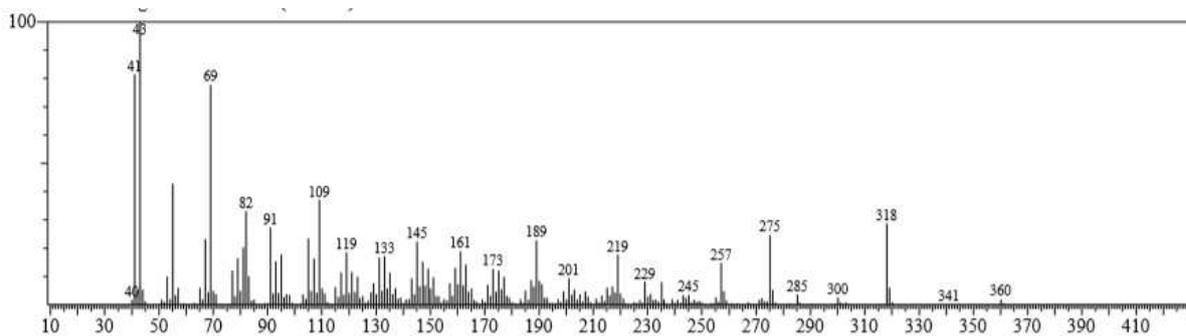


M2- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  BB DE DM-04 (75 MHZ, MEOD)



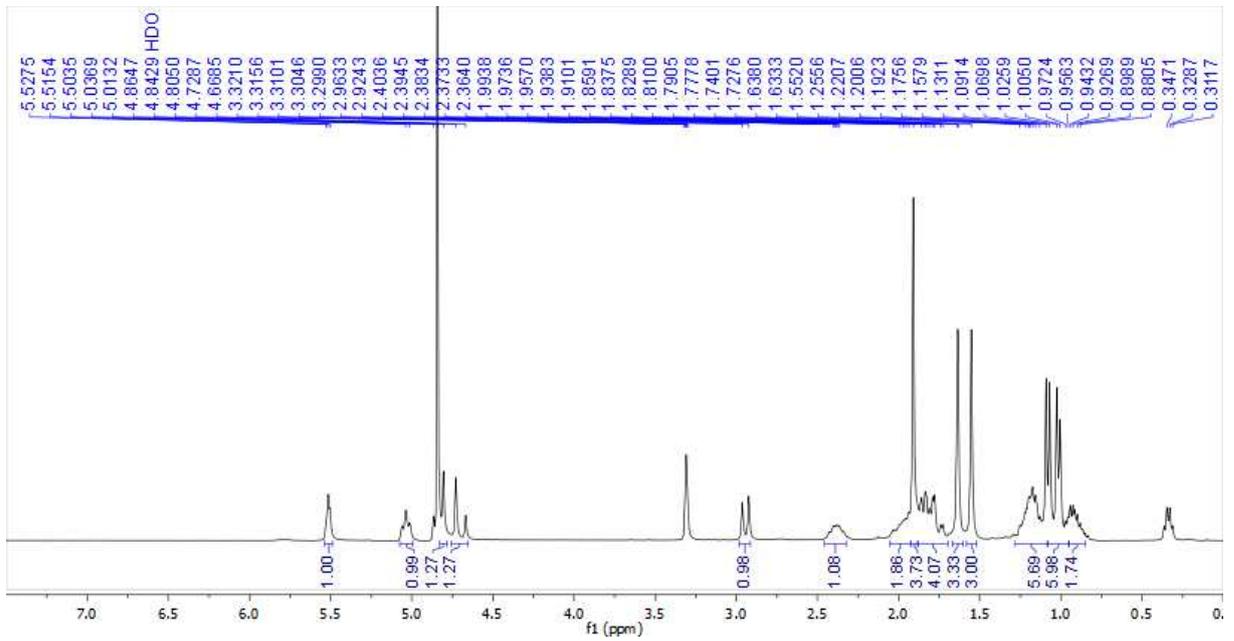
**M3- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  APT DE DM-04 (75 MHz, MEOD)****M4- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC DE DM-04 (MEOD)**

**M5- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE DM-04 (MEOD)****M6- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$  COSY DE DM-04 (MEOD)**

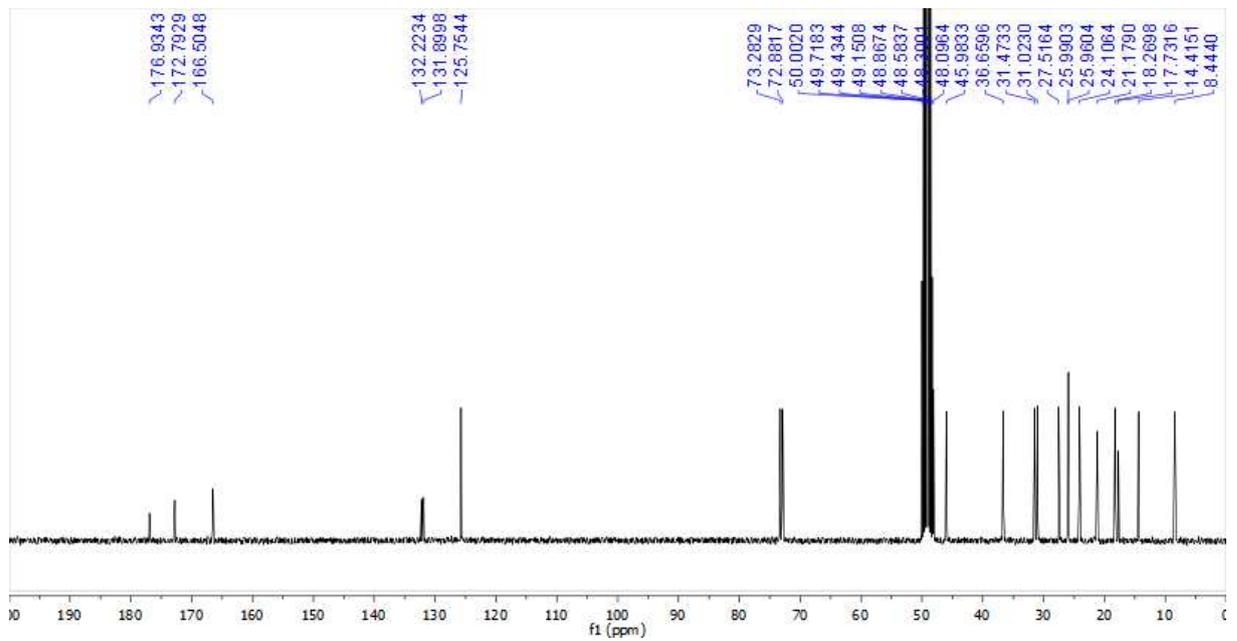
**M7 - ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NOESY DE DM-04 (MEOD)****M8 - ESPECTRO DE CGEM-IE DE DM-04**

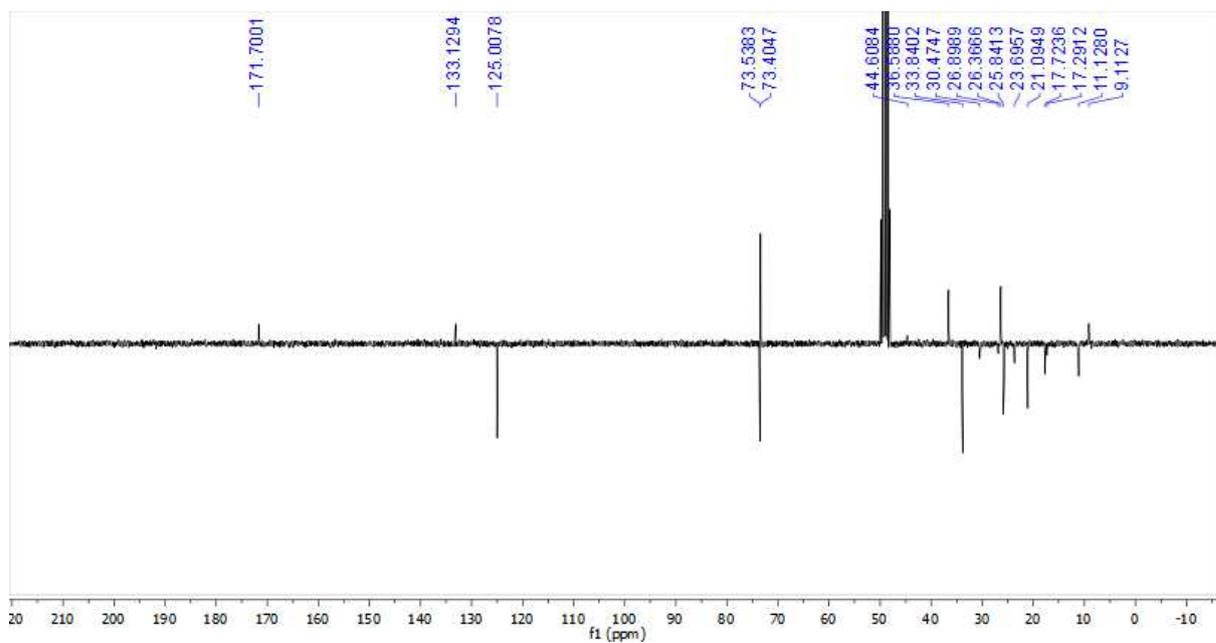
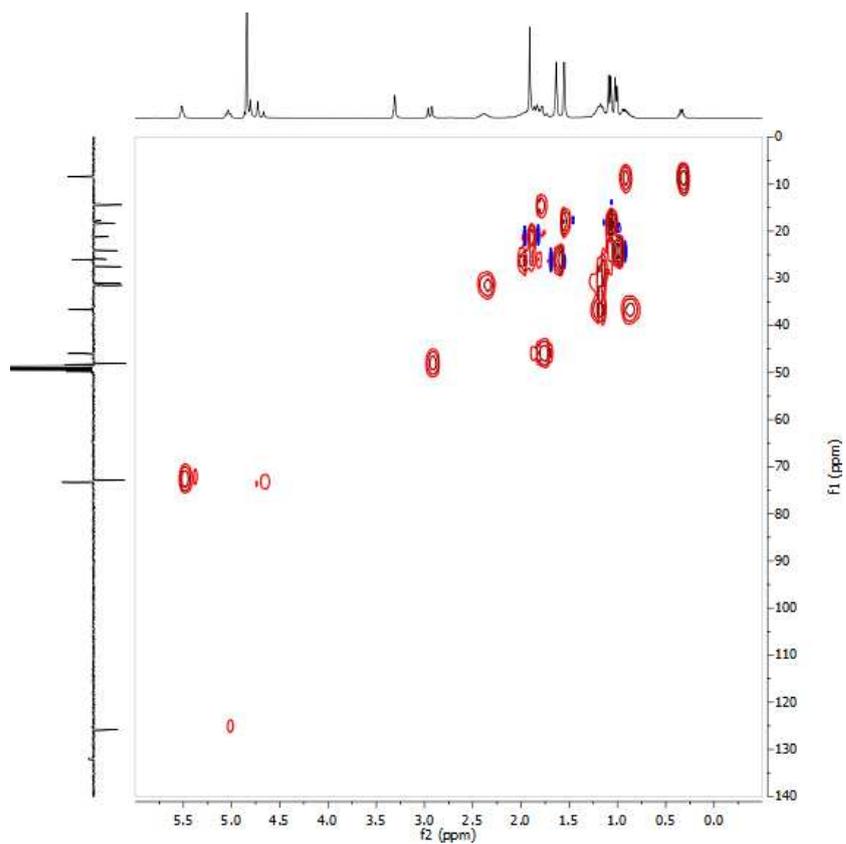
APÊNDICE N – DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  UNI E BIDIMENSIONAIS PARA  
ELUCIDAÇÃO DE DM-05

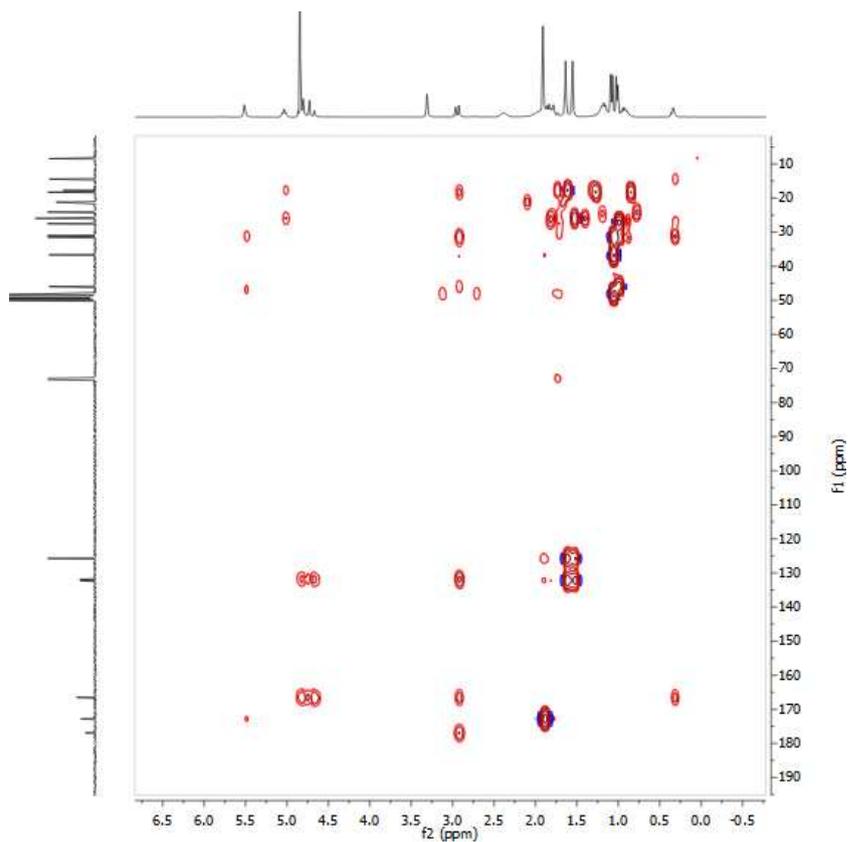
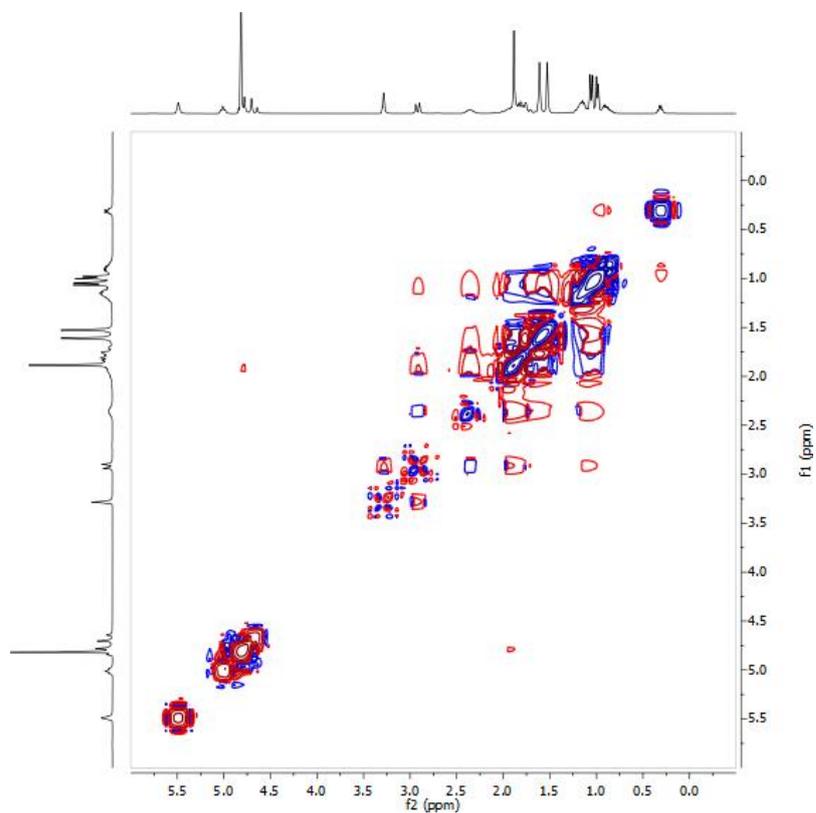
N1- ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DE DM-05 (300 MHZ, MEOD)



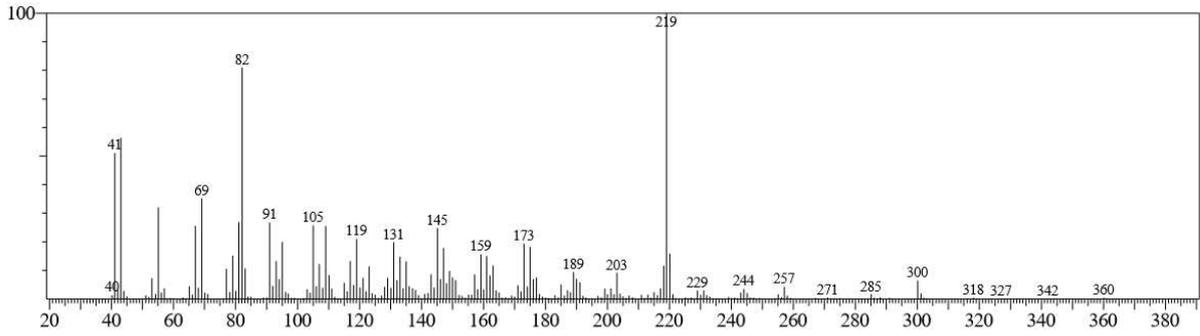
N2- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  BB DE DM-05 (75 MHZ, MEOD)



**N3- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  APT DE DM-05 (75 MHZ, MEOD)****N4- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC DE DM-05 (MEOD)**

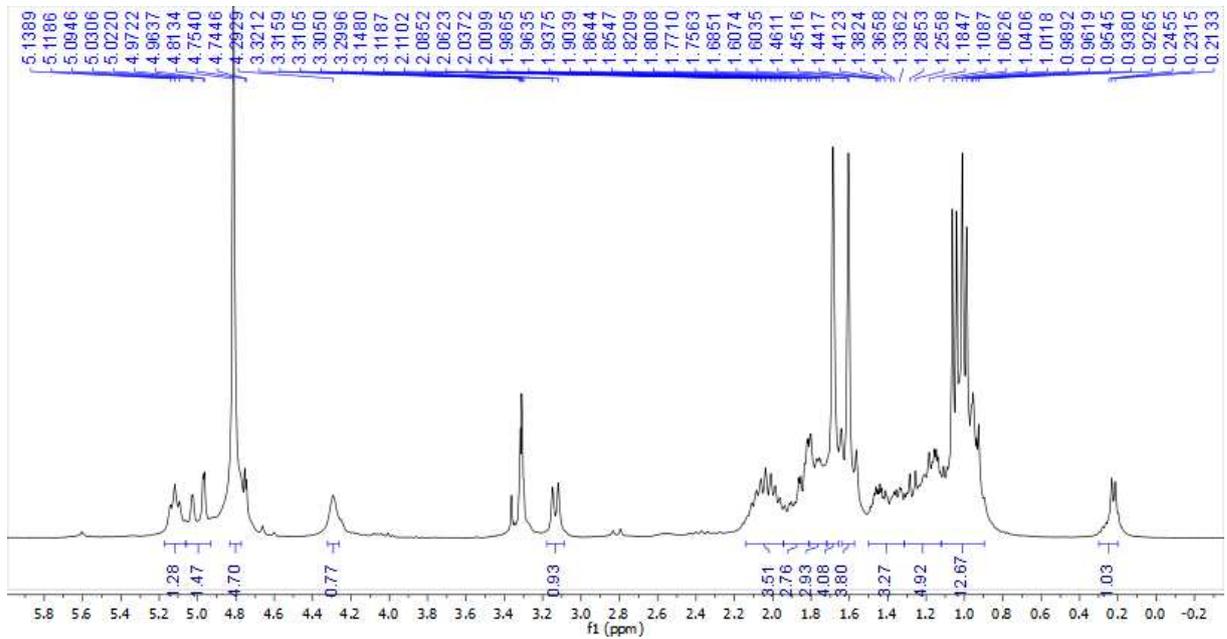
**N5- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE DM-05 (MEOD)****N6 - ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NOESY DE DM-05 (MEOD)**

### N7 - ESPECTRO DE CGEM-IE DE DM-05

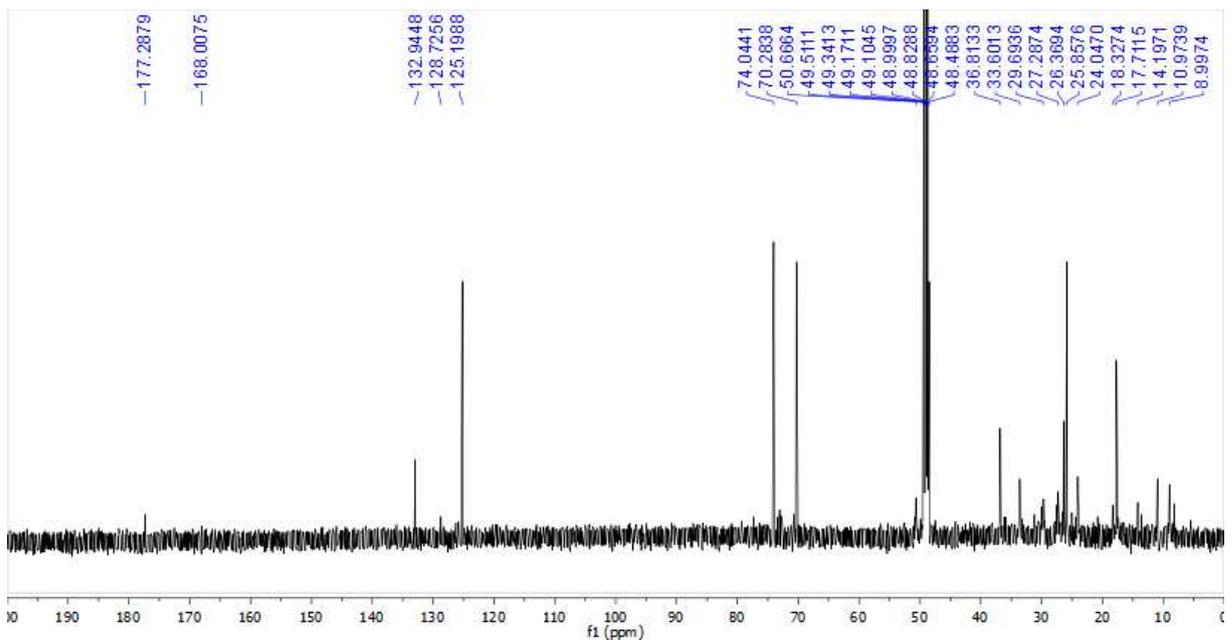


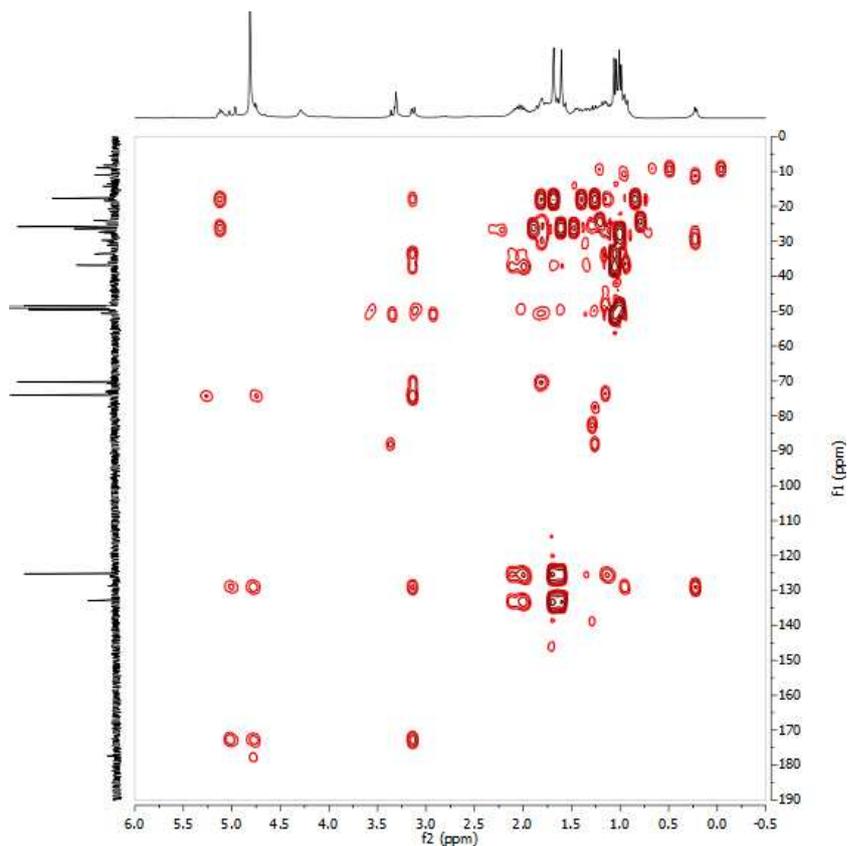
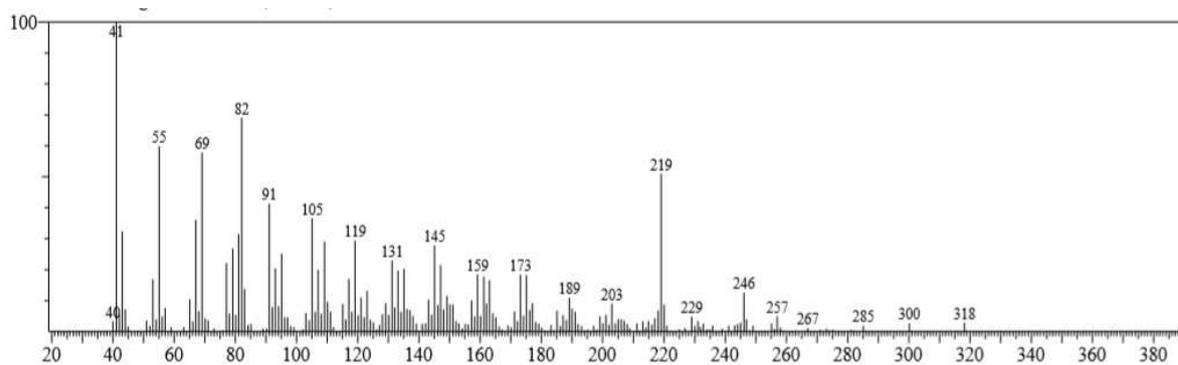
**APÊNDICE O – DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  UNI E BIDIMENSIONAIS PARA  
ELUCIDAÇÃO DE DM-06**

**O1- ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DE DM-06 (300 MHZ, MEOD)**



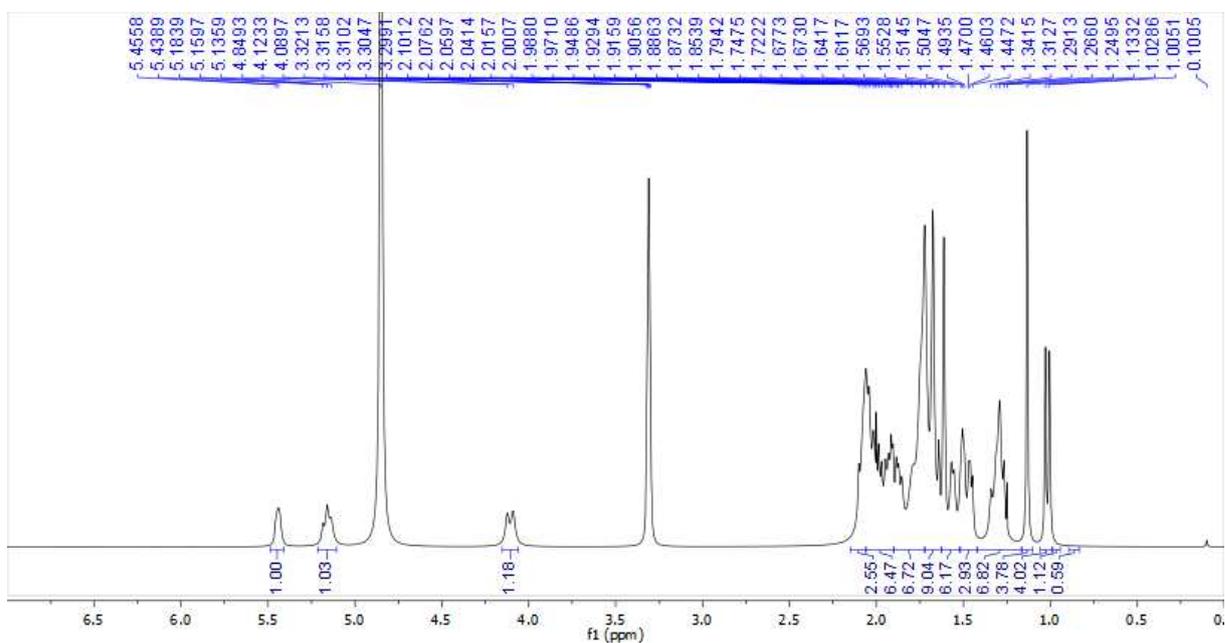
**O2- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  BB DE DM-06 (75 MHZ, MEOD)**



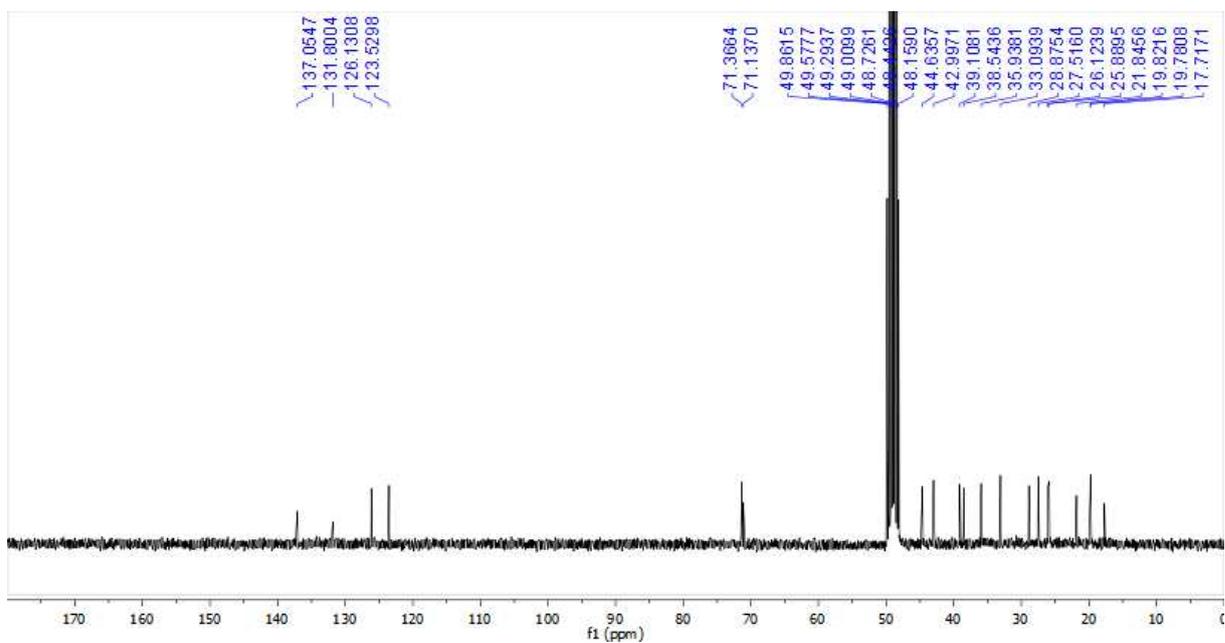
**O3- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE DM-06 (MEOD)****O4 - ESPECTRO DE CGEM-IE DE DM-06**

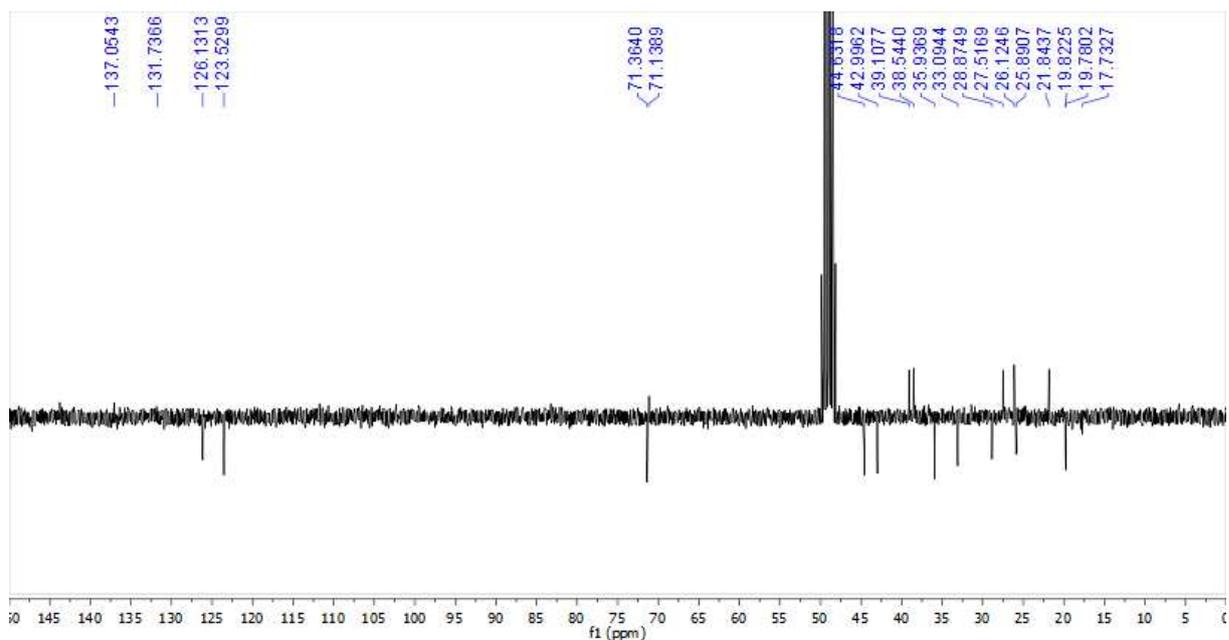
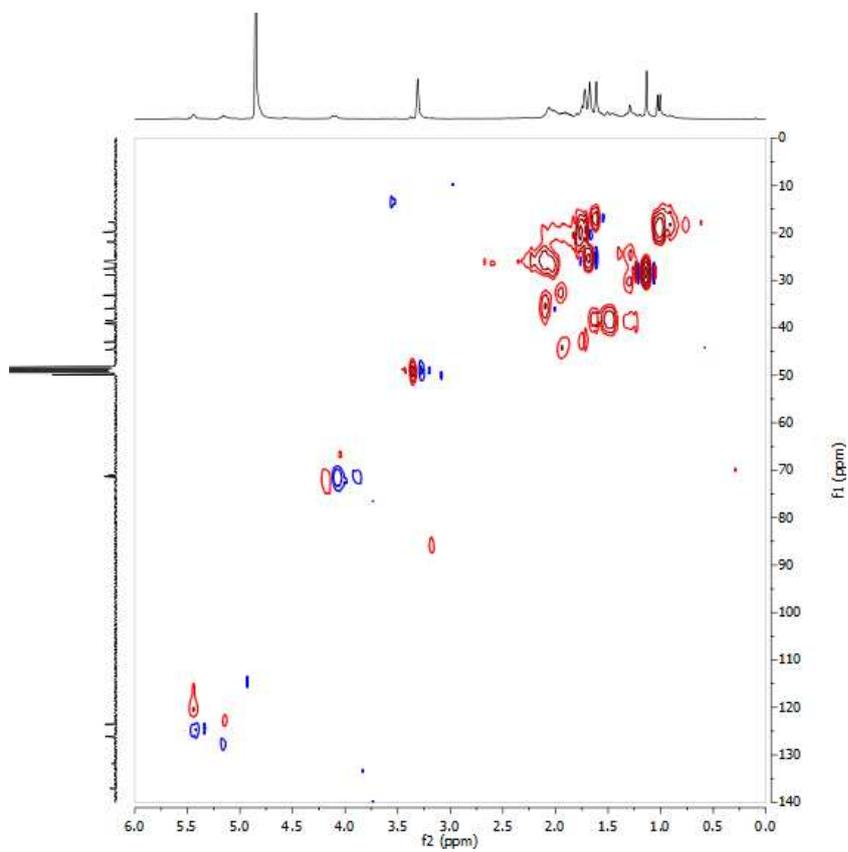
APÊNDICE P – DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  UNI E BIDIMENSIONAIS PARA  
ELUCIDAÇÃO DE DM-07

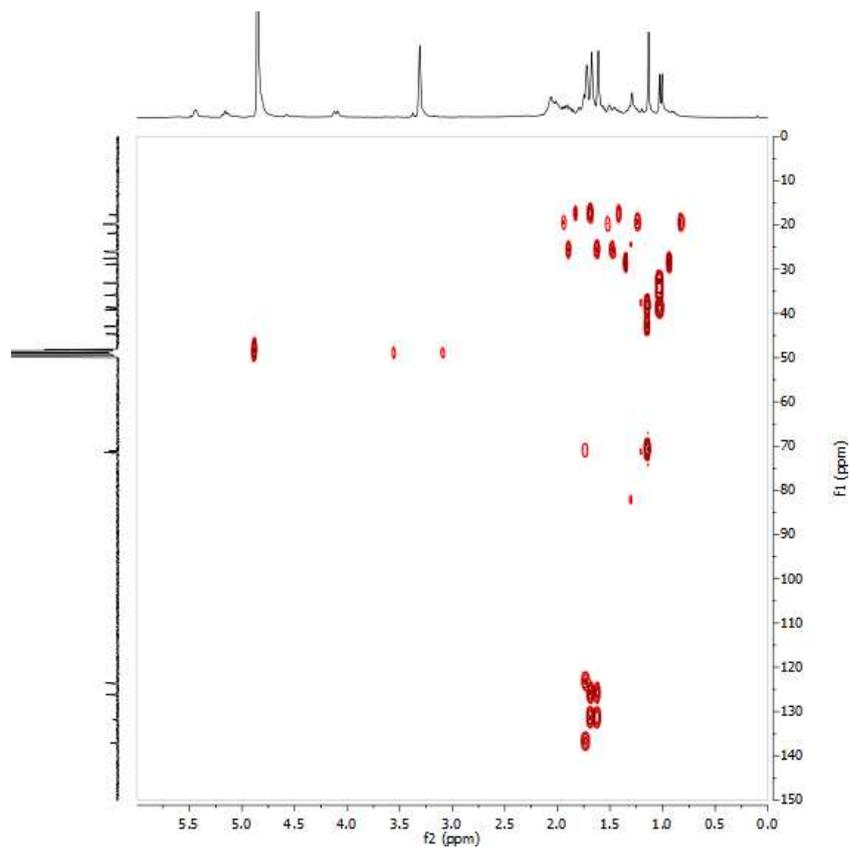
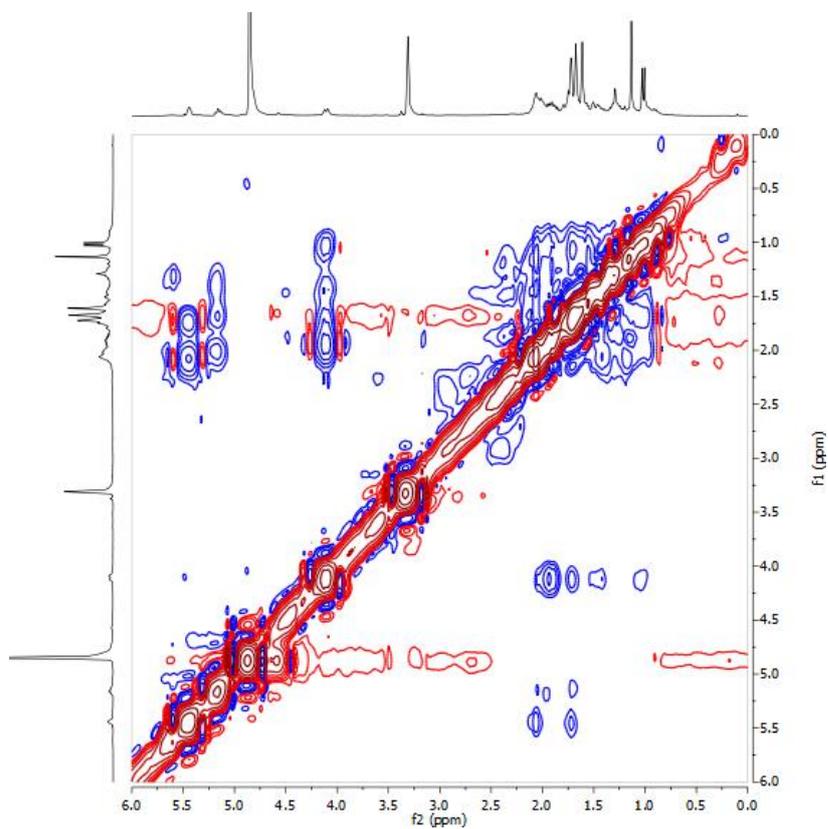
P1- ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DE DM-07 (300 MHZ, MEOD)

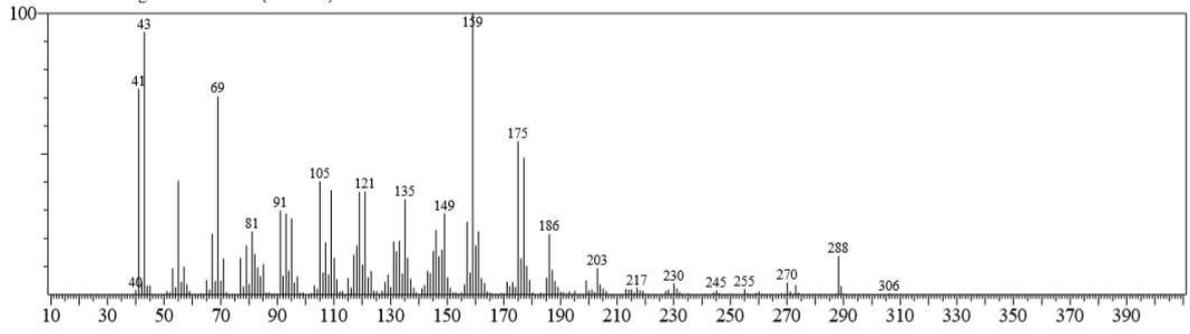


P2- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  BB DE DM-07 (75 MHZ, MEOD)



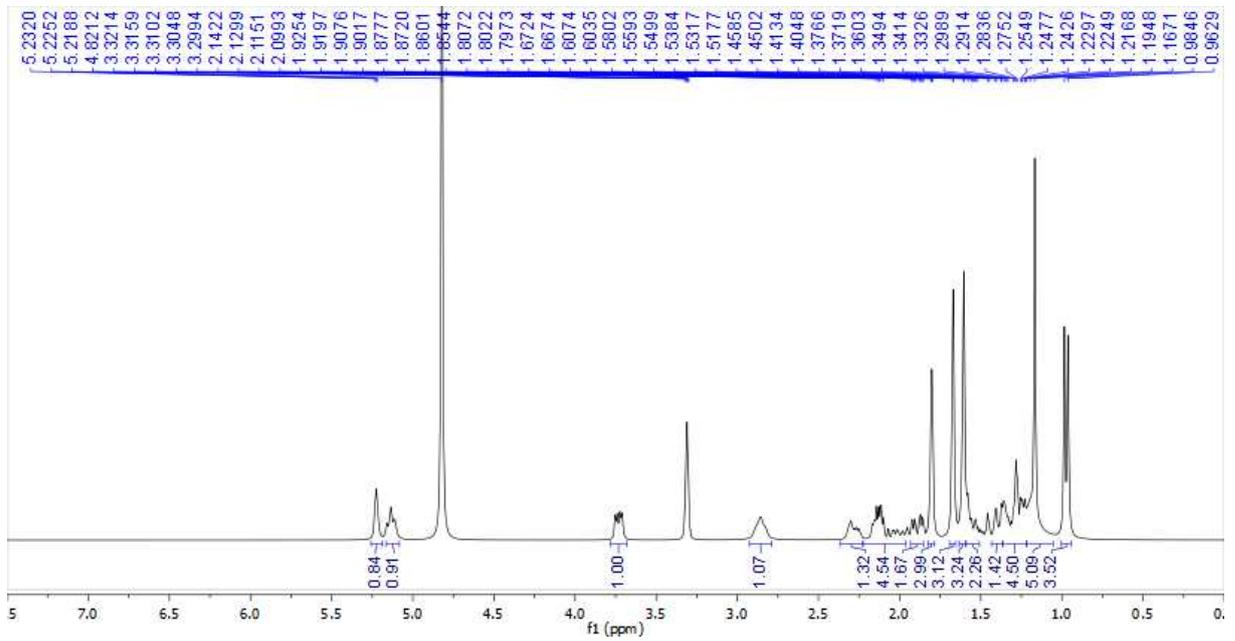
**P3- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  APT DE DM-07 (75 MHZ, MEOD)****P4- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC DE DM-07 (MEOD)**

**P5- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE DM-07 (MEOD)****P6 - ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NOESY DE DM-07 (MEOD)**

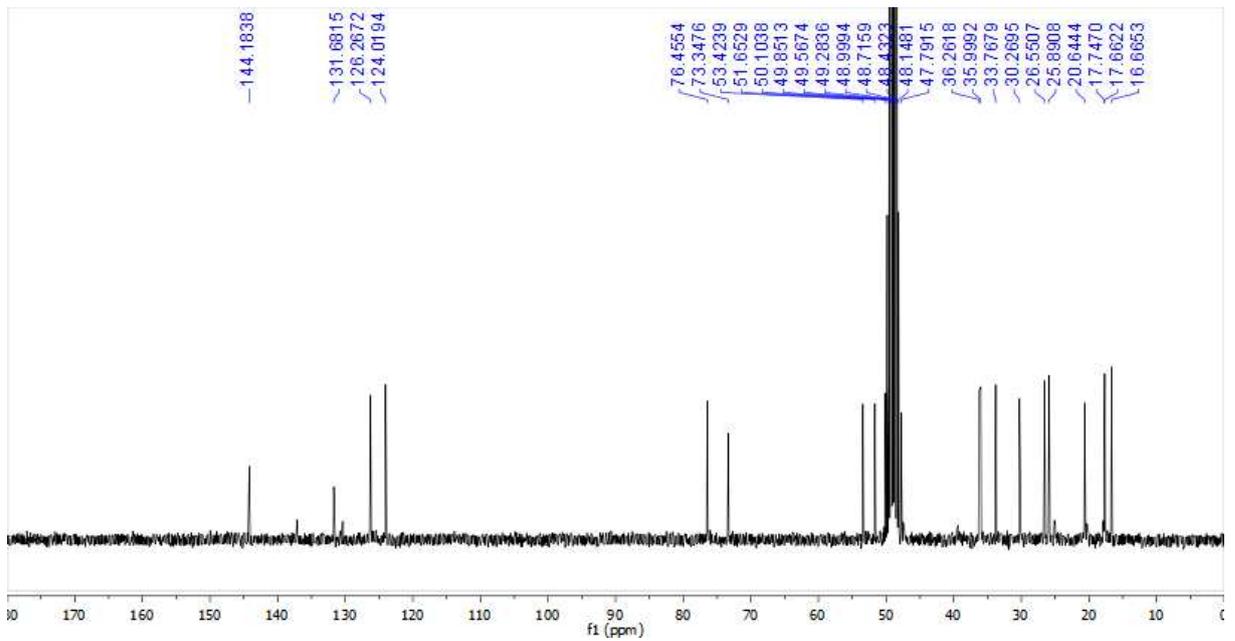
**P7 - ESPECTRO DE CGEM-IE DE DM-07**

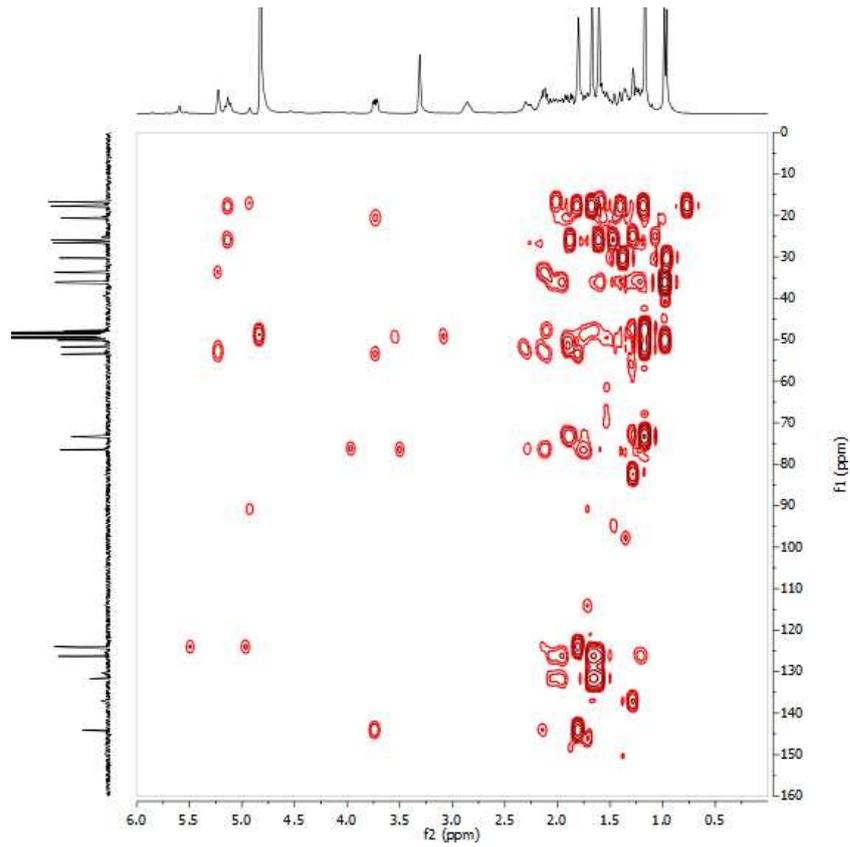
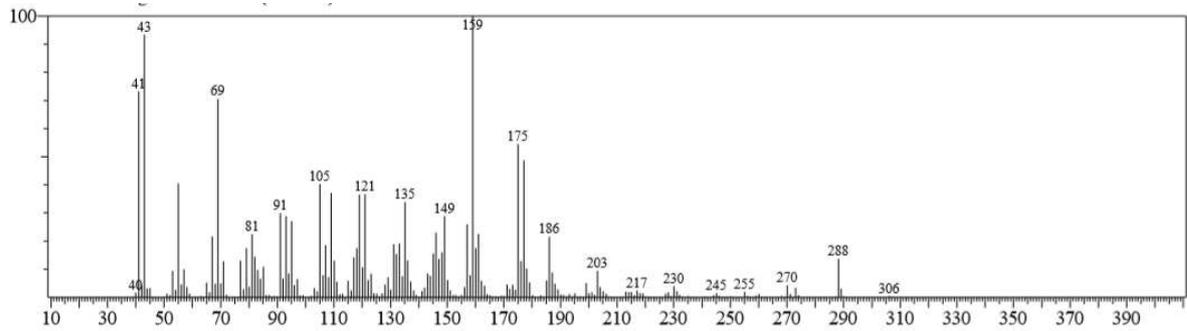
**APÊNDICE Q – DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-08**

**APÊNDICE Q1- ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DE DM-08 (300 MHZ, MEOD)**



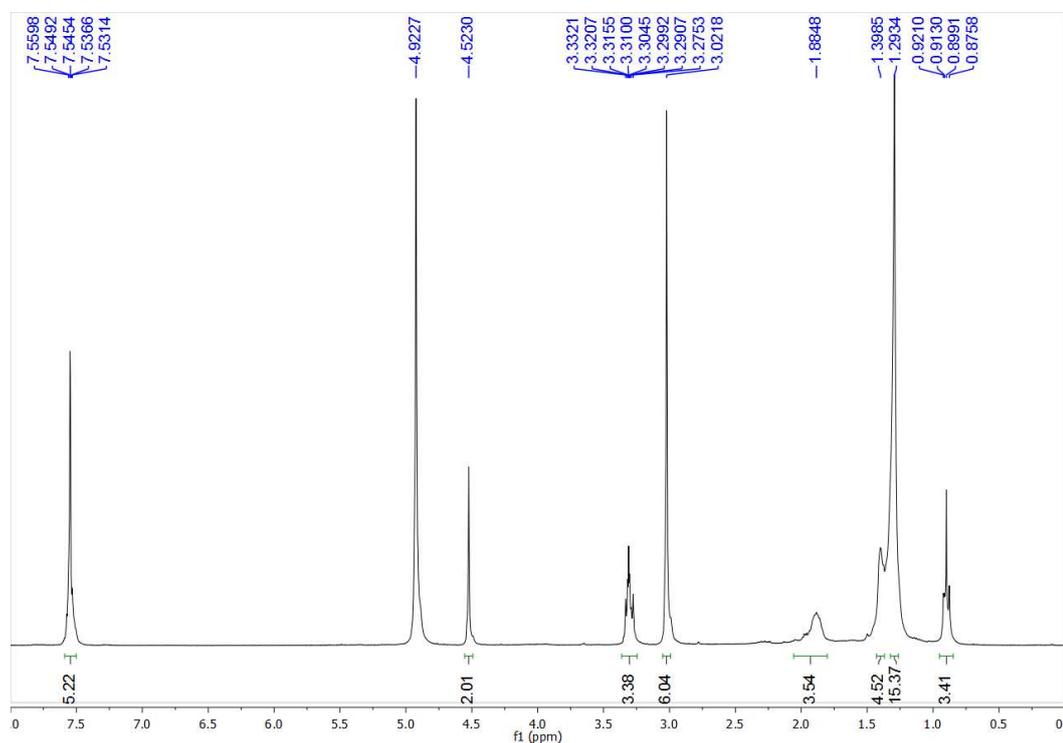
**Q2 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  BB DE DM-08 (75 MHZ, MEOD)**



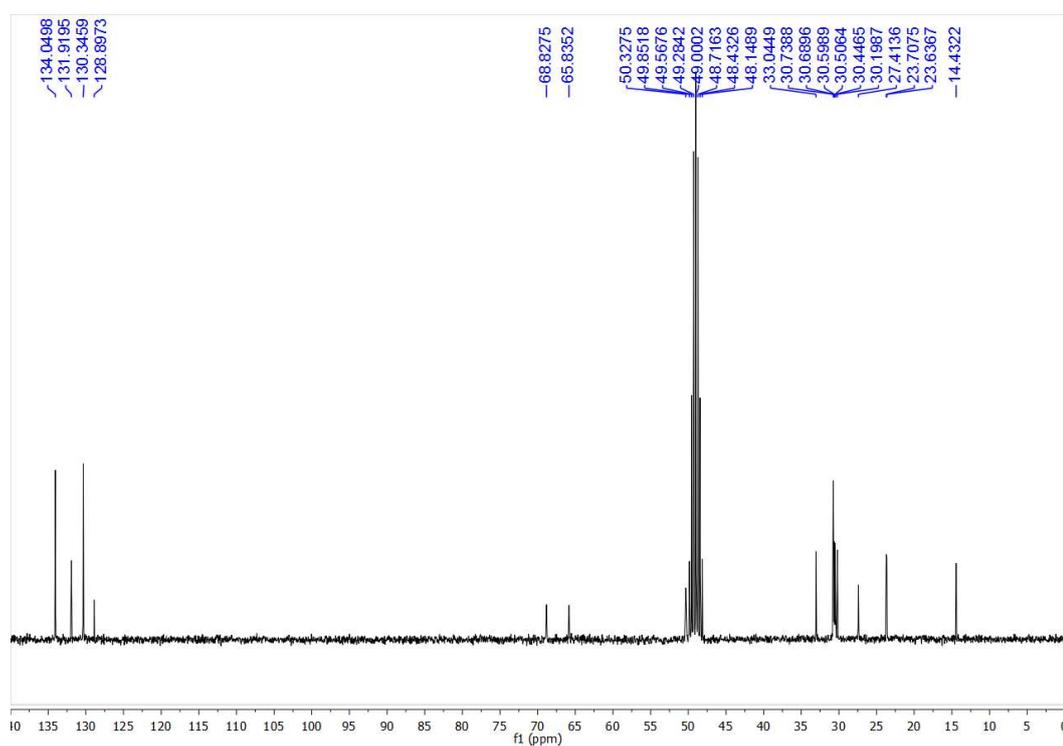
**Q3- ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE DM-08 (MEOD)****Q4 - ESPECTRO DE EMAR-ESI DE DM-08**

APÊNDICE R – DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  UNI E BIDIMENSIONAIS PARA  
ELUCIDAÇÃO DE DM-09

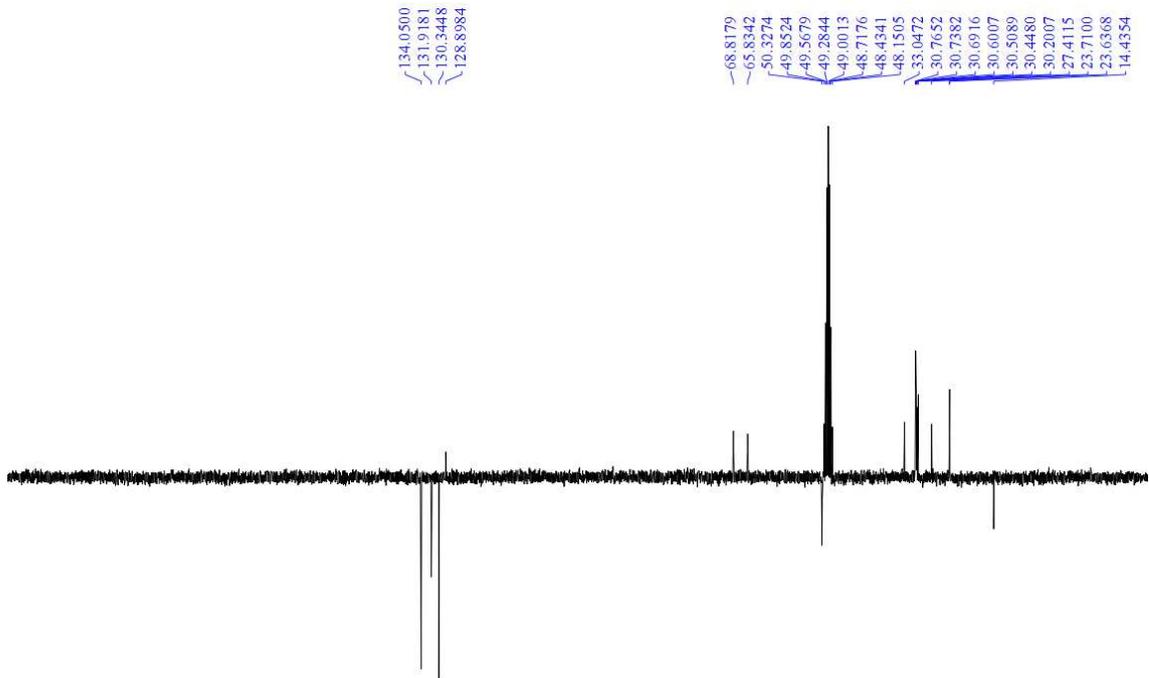
R1- ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DE DM-09 (300 MHZ, MEOD)



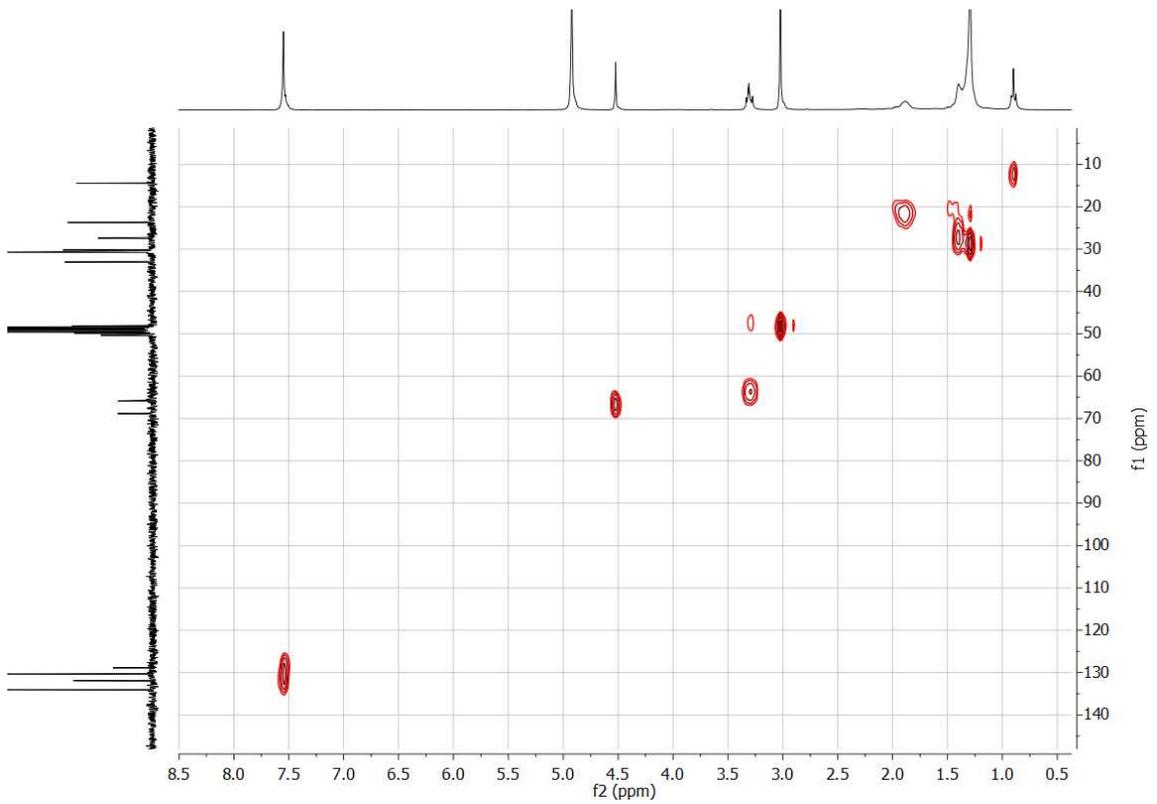
R2- ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  BB DE DM-09 (75 MHZ, MEOD)

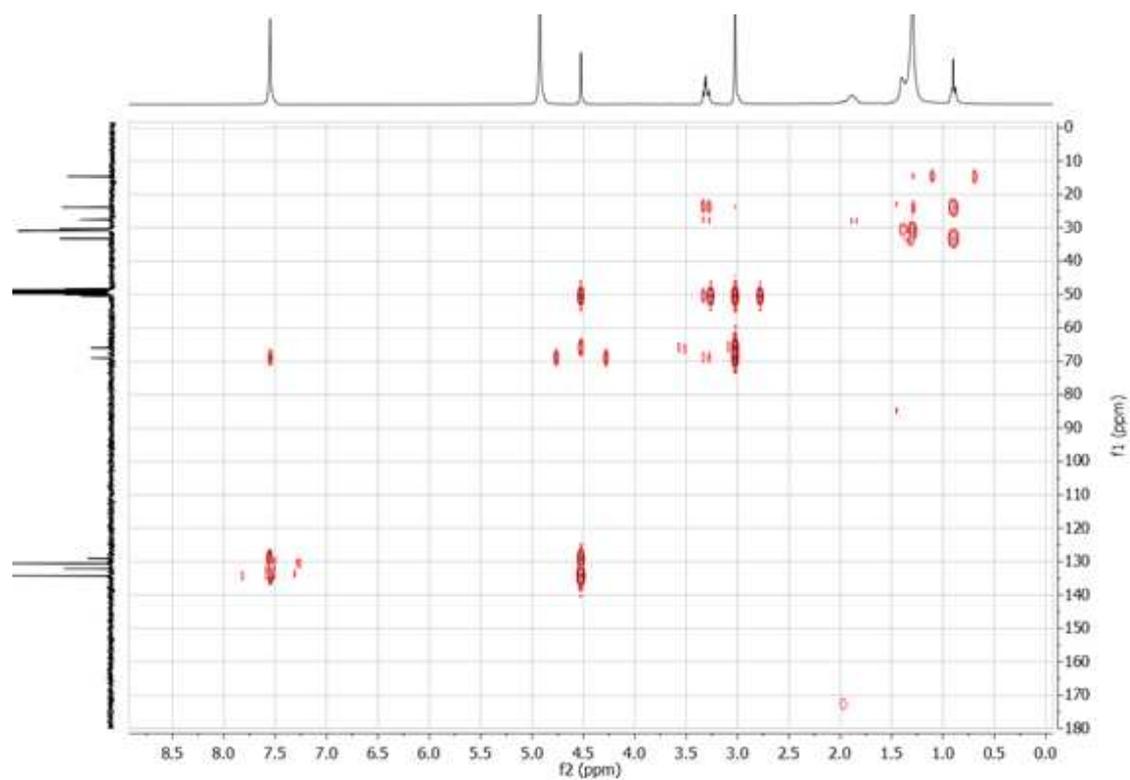
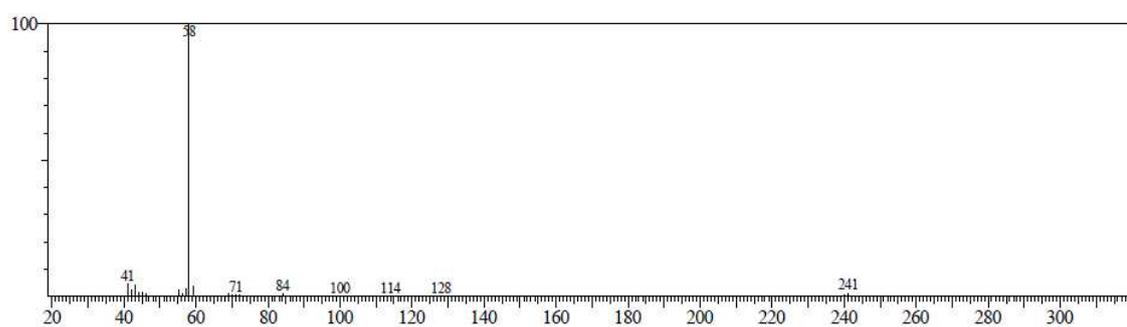


### R3 - ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ APT DE DM-09 (75 MHZ, MEOD)



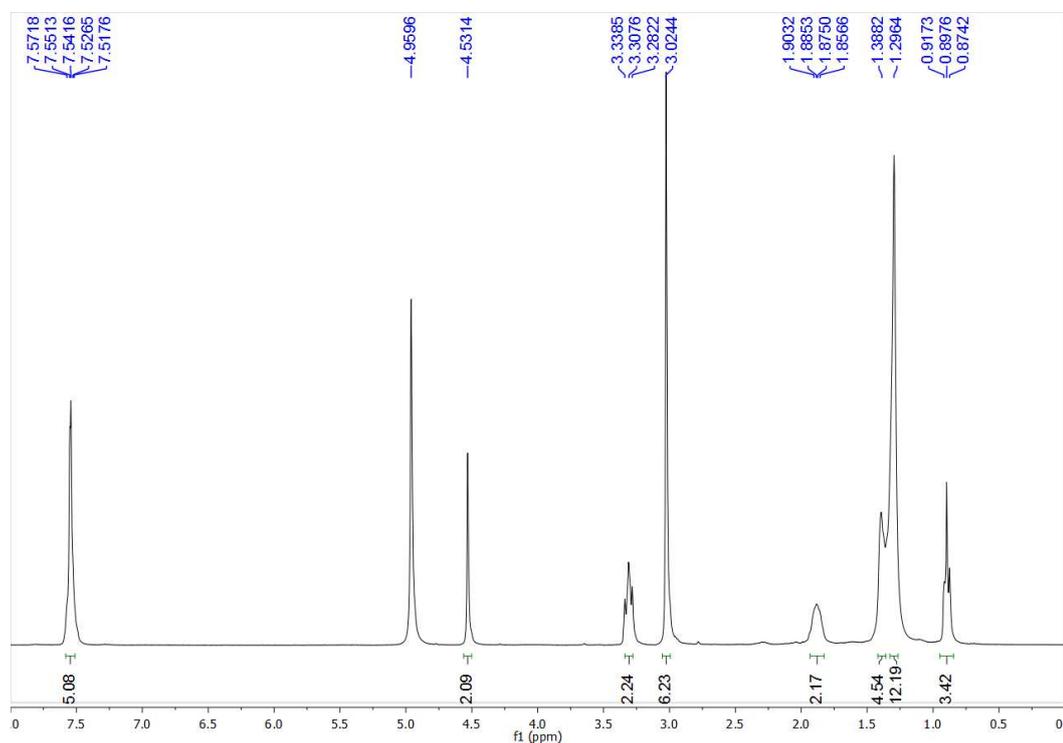
### R4- ESPECTRO DE RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC DE DM-09 (MEOD)



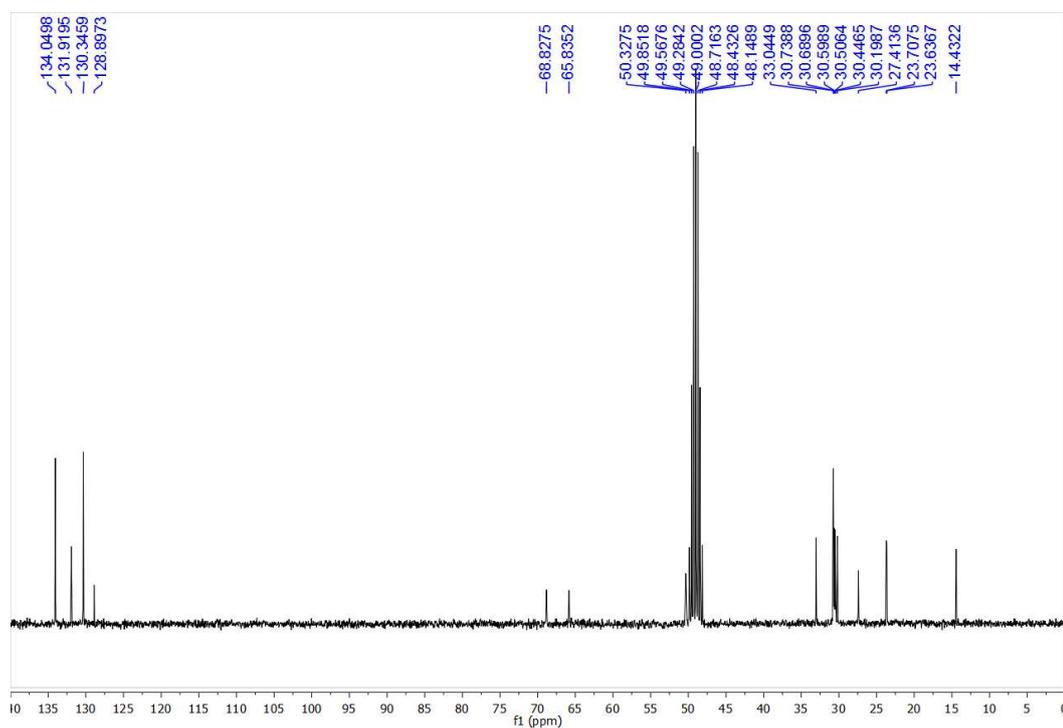
**R5 - ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE DM-09 (MEOD)****R7 - ESPECTRO DE CGEM-IE DE DM-09**

## APÊNDICE S – DADOS DE RMN $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-10

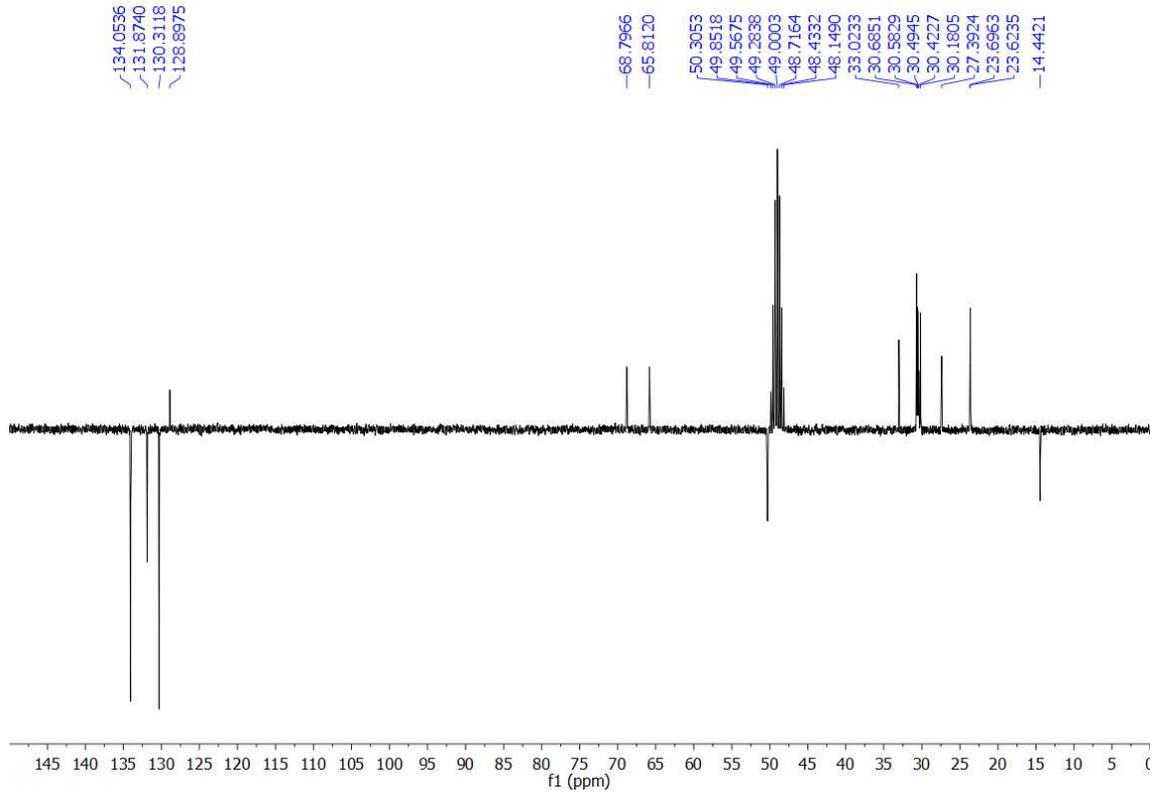
### S1 - ESPECTRO DE RMN $^1\text{H}$ DE DM-10 (300 MHZ, MEOD)



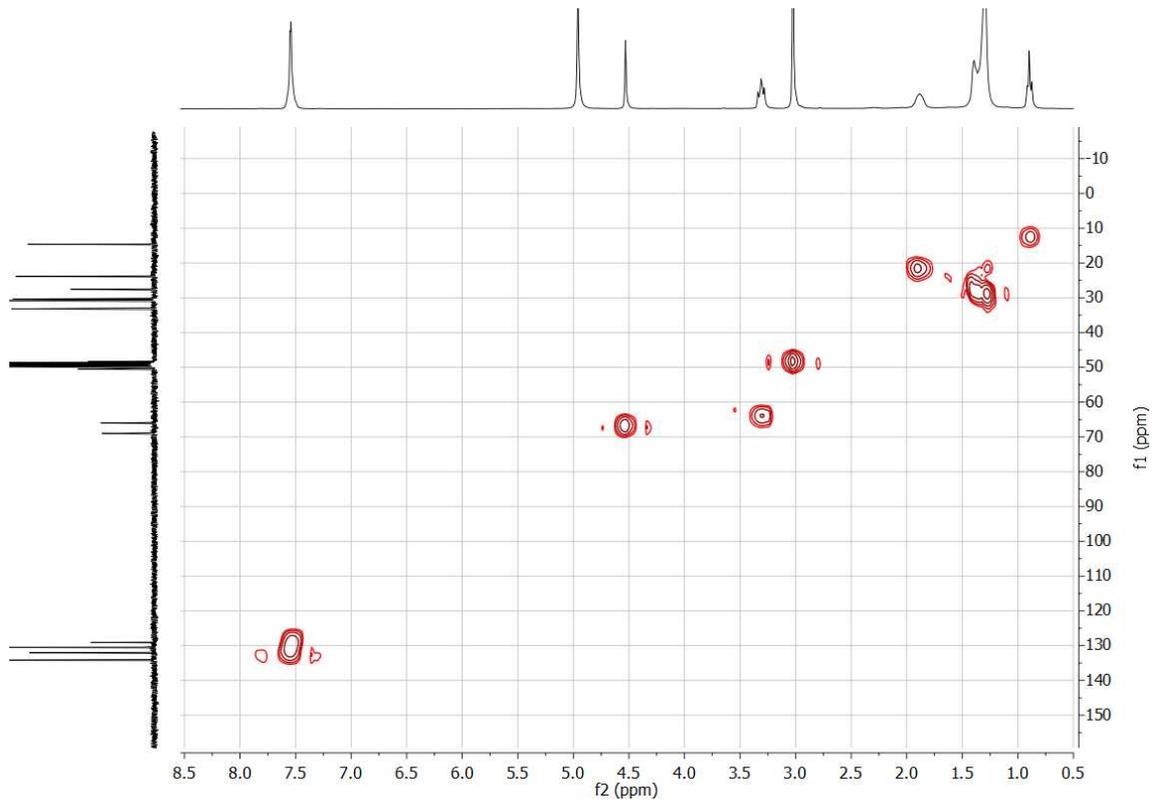
### S2 - ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ BB DE DM-10 (75 MHZ, MEOD)

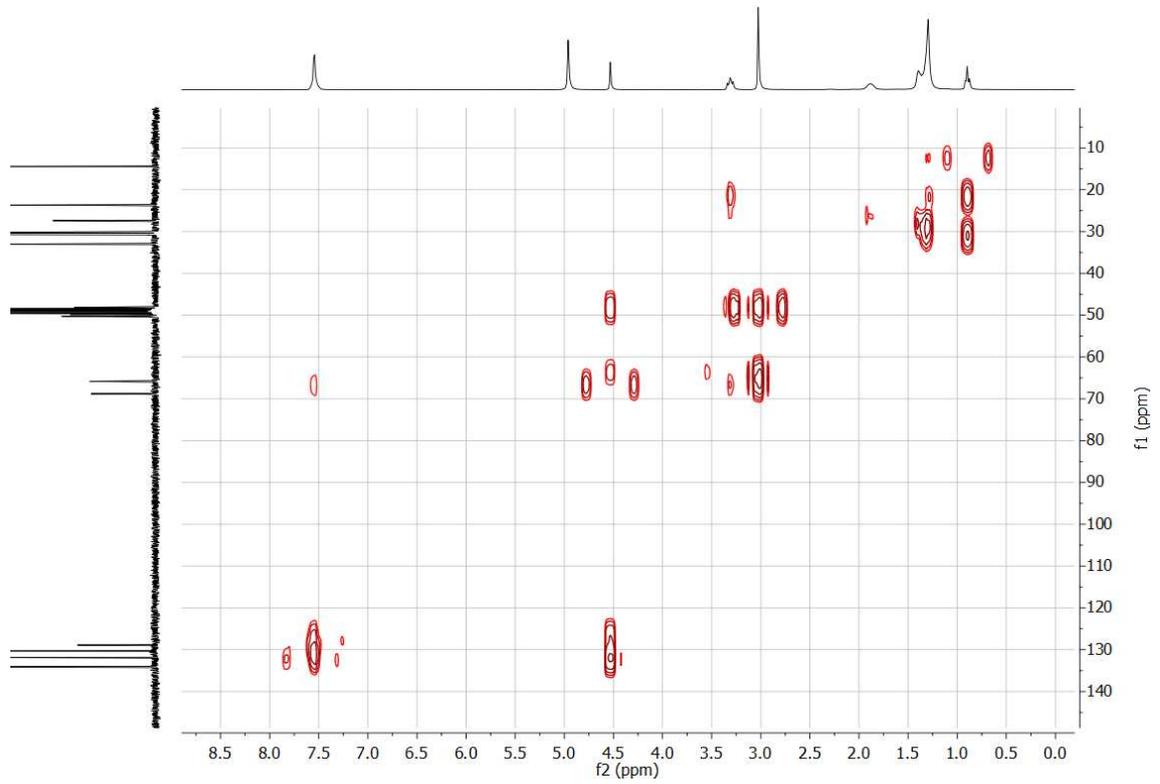
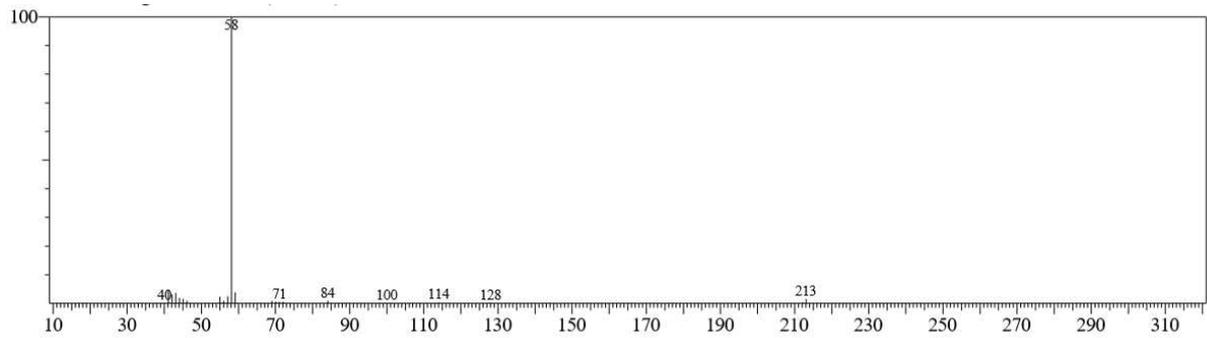


### S3 - ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ APT DE DM-10 (75 MHz, MEOD)



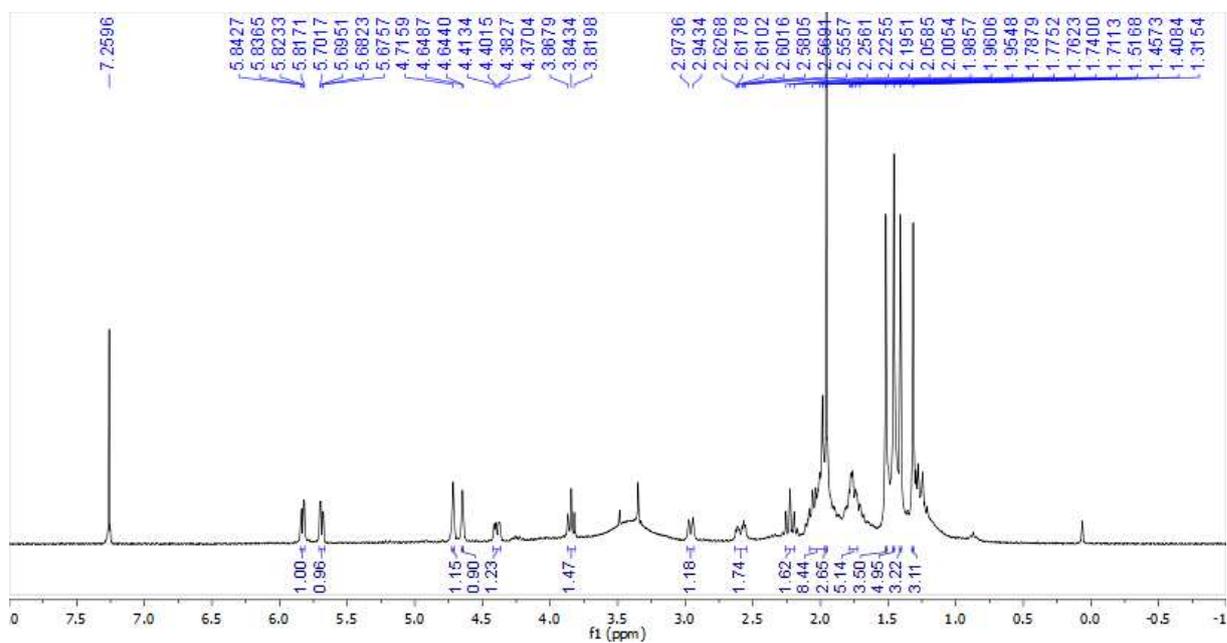
### S4 - ESPECTRO DE RMN 2D $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ HSQC DE DM-10 (MEOD)



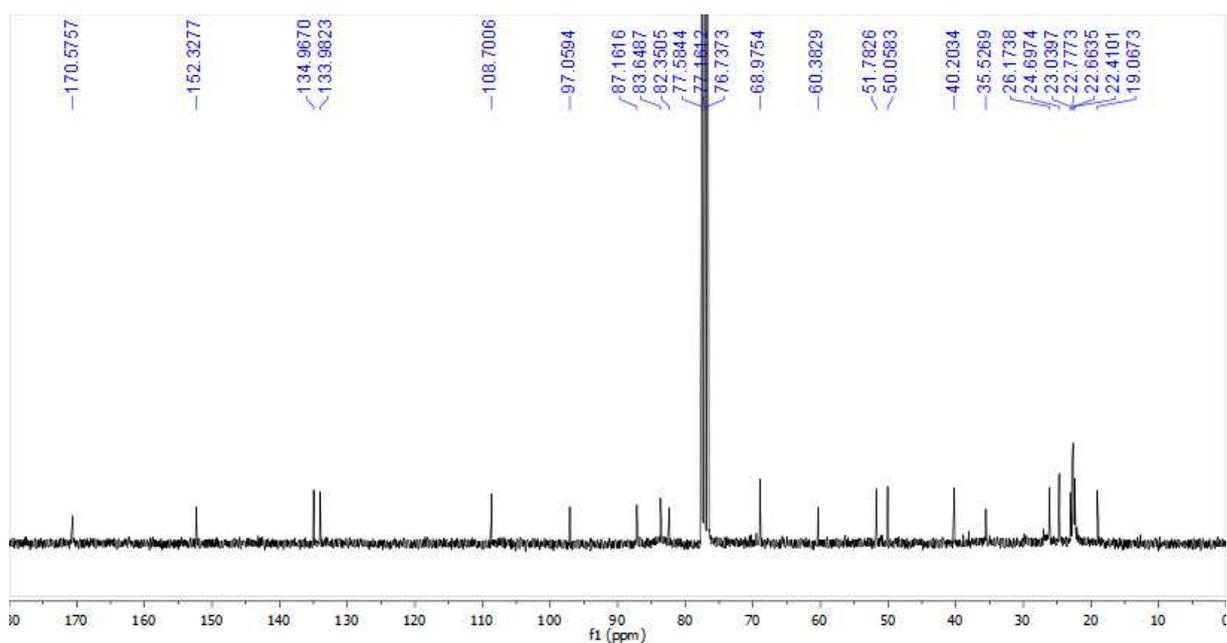
**S5 - ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE DM-10 (MEOD)****S6 - ESPECTRO DE CGEM-IE DE DM-10**

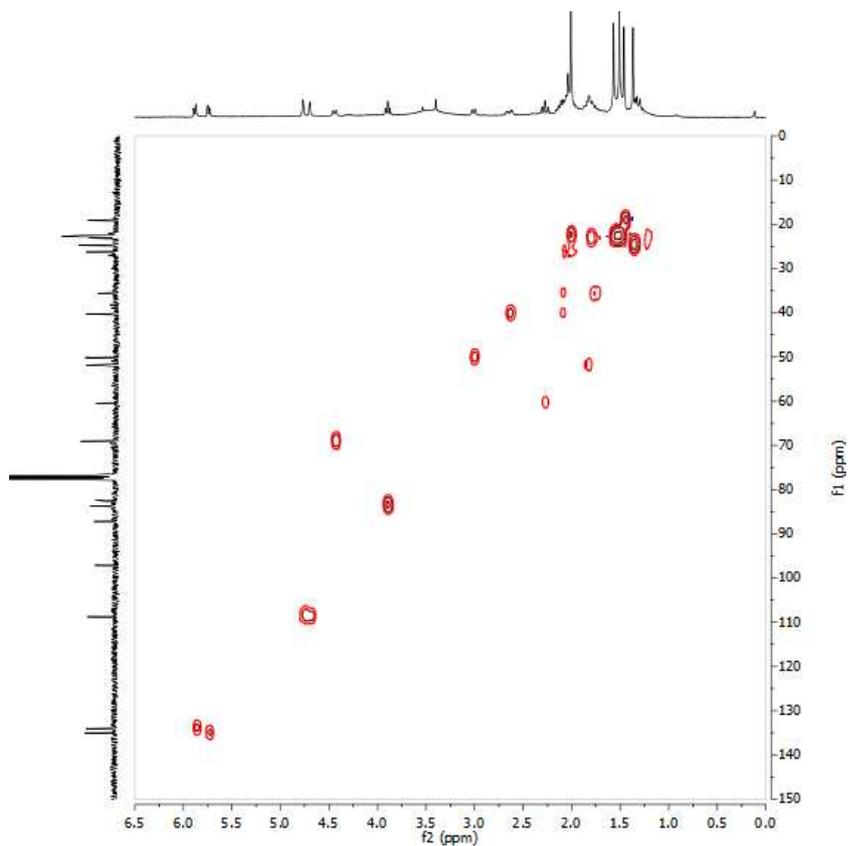
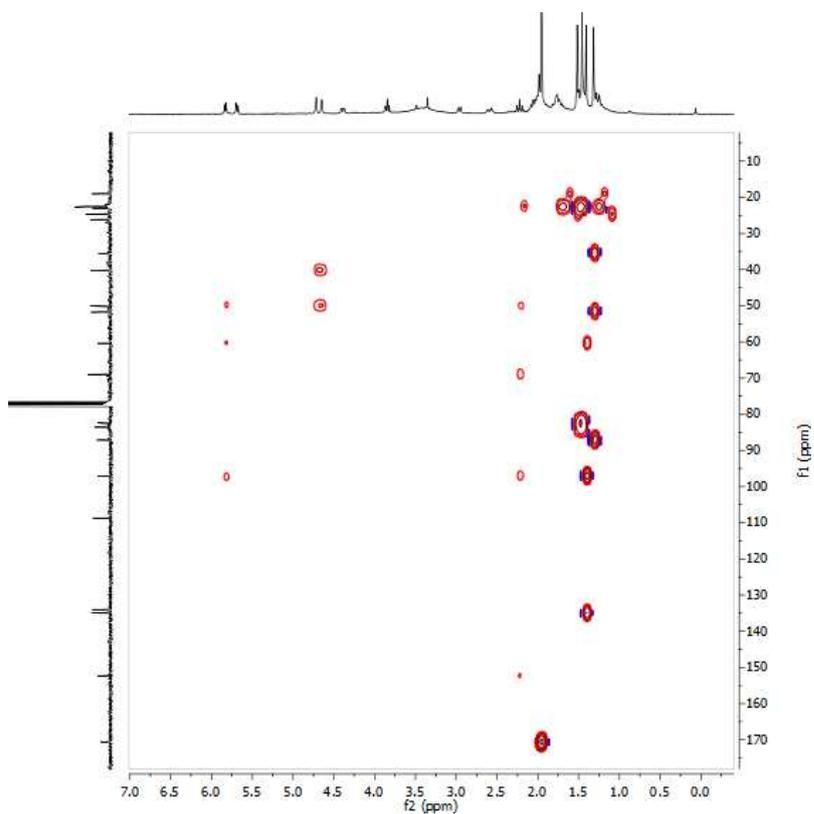
APÊNDICE T – DADOS DE RMN  $^1\text{H}$  E  $^{13}\text{C}$  UNI E BIDIMENSIONAIS PARA  
ELUCIDAÇÃO DE DM-11

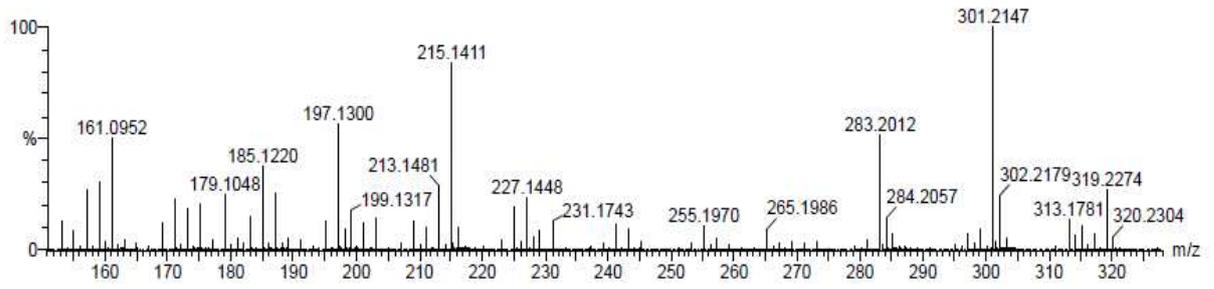
T1 - ESPECTRO DE RMN  $^1\text{H}$  DE DM-11 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



T2 - ESPECTRO DE RMN  $^{13}\text{C}$  BB DE DM-11 (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

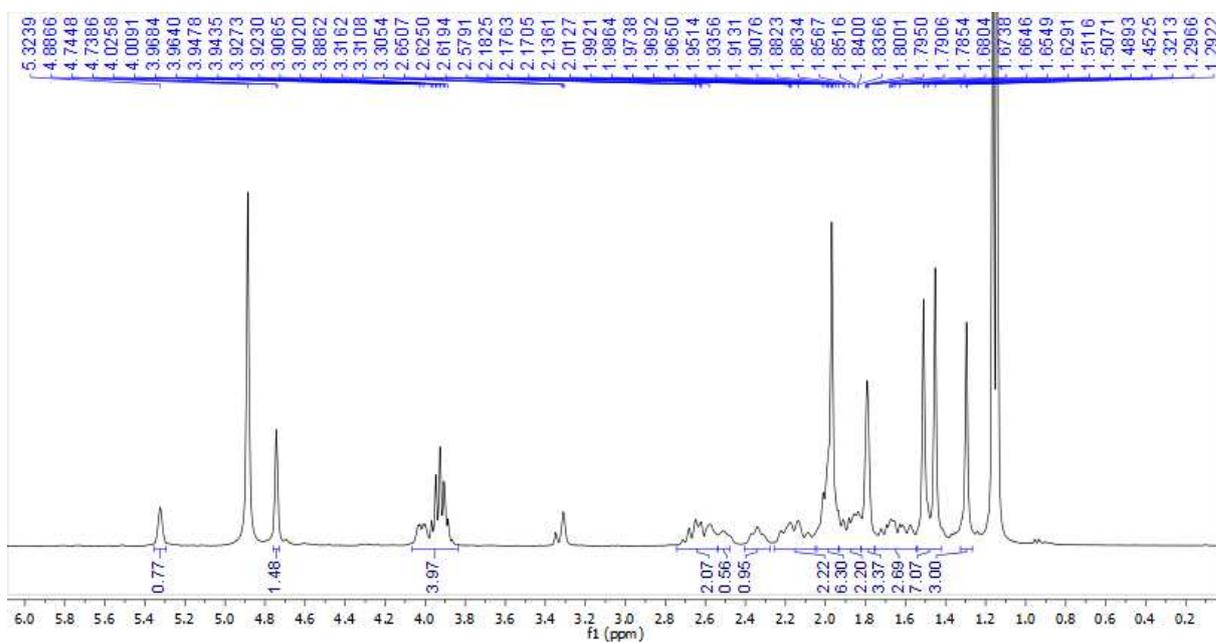


**T3 - ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HSQC DE DM-11 ( $\text{CDCl}_3$ )****T4 - ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE DM-11 ( $\text{CDCl}_3$ )**

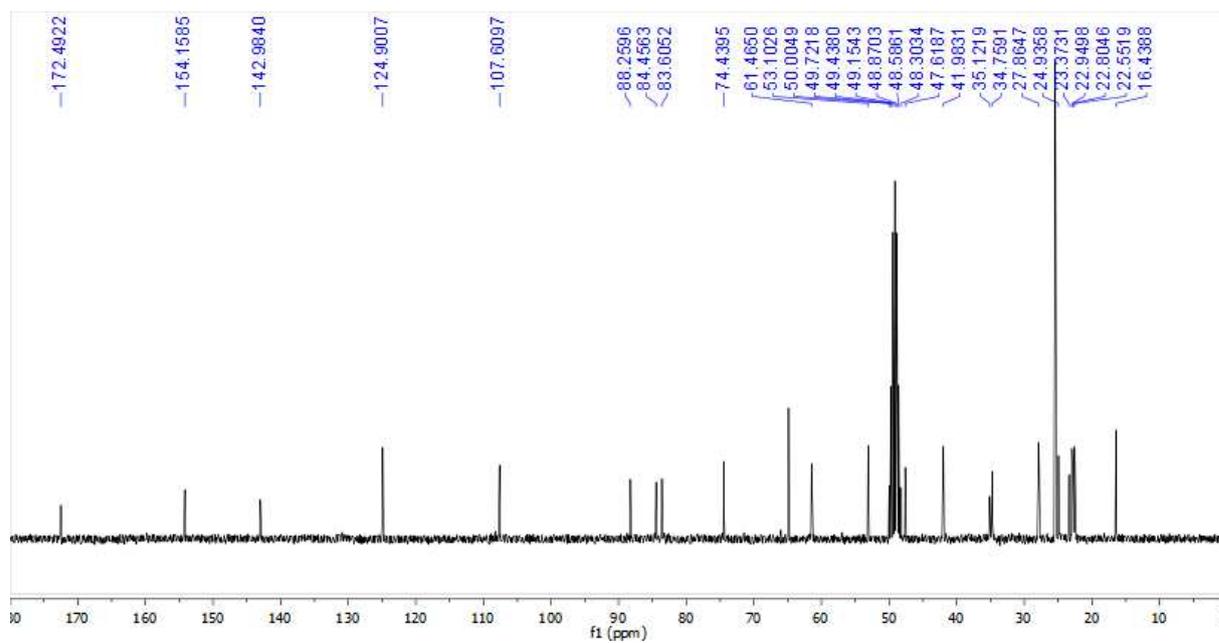
**T5 - ESPECTRO DE CGEM-IE DE DM-11**

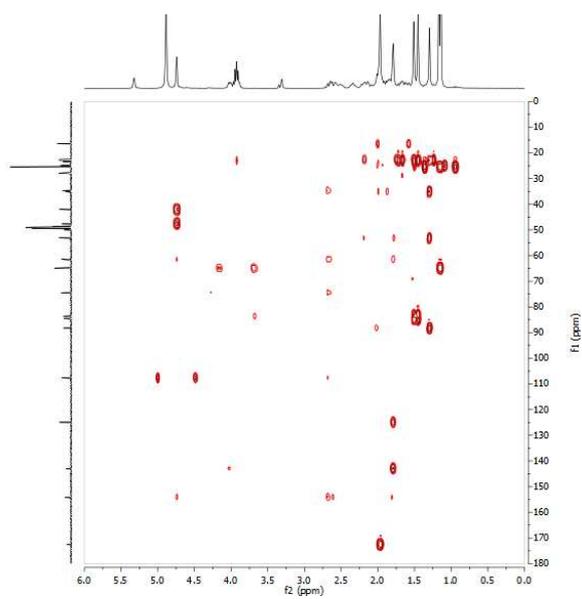
## APÊNDICE U – DADOS DE RMN $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-12

### U1- ESPECTRO DE RMN $^1\text{H}$ DE DM-12 (300 MHZ, MEOD)



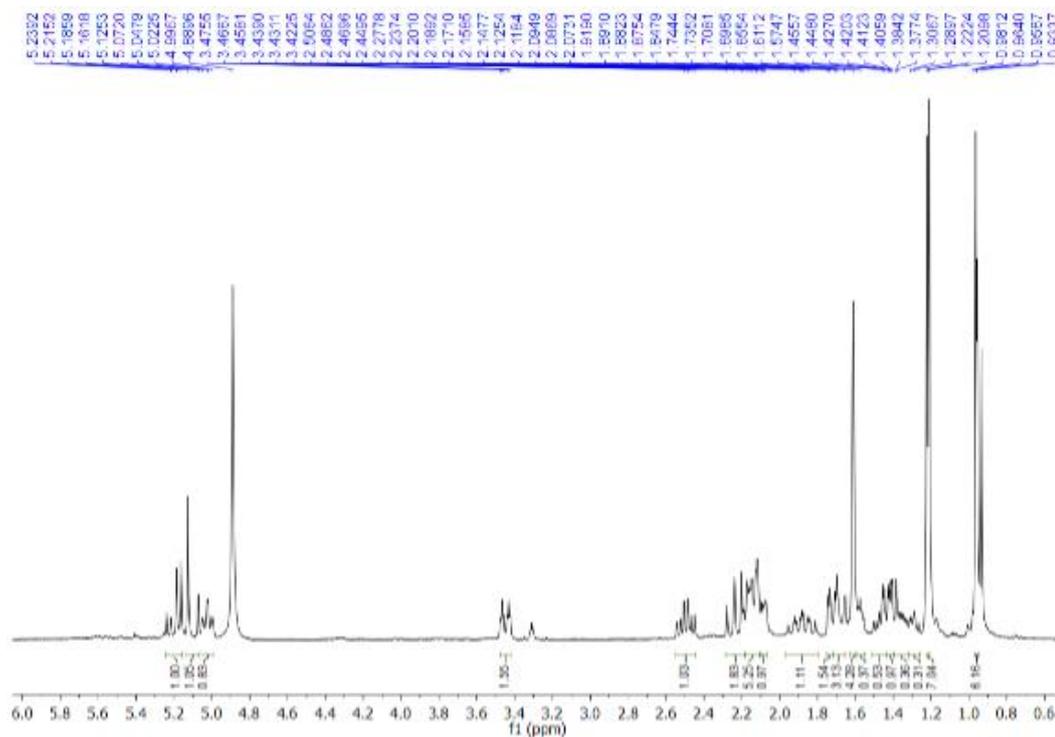
### U2 - ESPECTRO DE RMN $^{13}\text{C}$ BB DE DM-12 (75 MHZ, MEOD)



**U3 - ESPECTRO DE RMN 2D  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  HMBC DE DM-12 (MEOD<sub>3</sub>)**

## APÊNDICE V – DADOS DE RMN $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$ UNI E BIDIMENSIONAIS PARA ELUCIDAÇÃO DE DM-13

### V1 - ESPECTRO DE RMN $^1\text{H}$ DE DM-13 (300 MHZ, MEOD)



### V2 - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ BB de DM-13 (75 MHz, MeOD)

