



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

NEILYANE DE PAULA FERNANDES

***DICTYOTA MERTENSII*: INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E
FARMACOLÓGICA DE SEUS EXTRATOS**

FORTALEZA

2018

NEILYANE DE PAULA FERNANDES

DICTYOTA MERTENSII: INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E
FARMACOLÓGICA DE SEUS EXTRATOS

Monografia apresentada ao Curso de Química Bacharelado do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química com habilitação em Química Bacharel.

Orientadora: Prof^a. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa.

Co-orientador: Me. Fábio do Nascimento Ávila

Fortaleza

2018

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

F41d Fernandes, Neilyane de Paula.
 Dictyota mertensii: investigação química e farmacológica de seus extratos / Neilyane de Paula Fernandes. –
 2018.
 73 f. : il. color.

 Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências,
 Curso de Química, Fortaleza, 2018.

 Orientação: Profa. Dra. Otilia Deusdênia Loiola Pessoa.

 Coorientação: Prof. Me. Fábio do Nascimento Ávila.

 1. Produtos Naturais. 2. Dictyota mertensii. 3. Diterpenos. I. Título.

CDD 540

NEILYANE DE PAULA FERNANDES

DICTYOTA MERTENSII: INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E
FARMACOLÓGICA DE SEUS EXTRATOS

Monografia apresentada ao Curso de
Química Bacharelado do
Departamento de Química Orgânica
e Inorgânica da Universidade
Federal do Ceará, como requisito
parcial para obtenção do título de
Bacharel em Química com
habilitação em Química Bacharel.

Aprovada em ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Jair Mafezoli
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Francisco das Chagas Lima Pinto
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos meus pais, Neily e Francivaldo,
meus irmãos, David e Kelyane e
minha avó, Olívia.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Neily e Francivaldo, pelo incentivo e apoio nas minhas decisões, não permitindo que eu jamais desista dos meus sonhos.

Aos meus irmãos, David e Kelyane, pela companhia em todos os momentos de nossas vidas e minha família que sempre esteve presente quando eu precisava, em especial minha avó, Olívia.

À Prof^a. Dra. Otília Deusdênia Loiola Pessoa, por ser uma grande professora e orientadora, pela oportunidade de ser sua bolsista e por todo o aprendizado durante a realização deste trabalho.

Ao Me. Fábio do Nascimento Ávila, pela excepcional co-orientação, paciência e empenho em me auxiliar durante a realização deste trabalho.

Aos participantes da banca examinadora, Prof. Dr. Jair Mafezoli e Dr. Francisco das Chagas Lima Pinto, pela leitura e críticas construtivas para o engrandecimento desse trabalho.

Aos colegas do LAFIPLAM, pelas contribuições, sugestões e momentos de descontração, em especial, Francisco das Chagas e Fábio Ávila, pela prontidão em responder minhas inúmeras perguntas.

Aos amigos que fiz na UFC, que sofreram e sorriram comigo ao longo desse caminho, os quais não esquecerei, muito obrigada pelas horas de estudos e momentos de descontração. Em especial minhas amigas Angélica e Jamylly que me apoiaram e me incentivaram, principalmente nessa reta final.

Ao Dr. Pedro Bastos de Macedo Carneiro pelo auxílio na coleta e identificação da alga.

À Prof^a. Dra. Flávia Almeida Santos e à doutoranda Greyce Luri Sasahara, do Laboratório de Produtos Naturais, pela realização dos testes farmacológicos.

À Universidade Federal do Ceará e aos profissionais que contribuíram para minha formação e desenvolvimento desse trabalho.

À CAPES, CNPq (PIBIC) e FUNCAP pelas bolsas de pesquisa e suporte financeiro para a realização deste trabalho.

“O que eu faço é uma gota no meio de um oceano, mas sem ela, o oceano será menor.”

(Madre Teresa de Calcutá).

RESUMO

Os produtos naturais marinhos representam um grande potencial para a descoberta de novos fármacos. Dentre os grupos de organismos marinhos, produtores de compostos de interesse, estão as macroalgas com destaque para as algas pardas, que incluem cerca de 1800 espécies agrupadas em 285 gêneros. Estas são produtoras de substâncias estruturalmente variadas e que apresentam uma vasta gama de propriedades biológicas e farmacológicas. O gênero *Dictyota* é conhecido como uma rica fonte de metabólitos secundários, principalmente de diterpenos de esqueletos xenicanos, guaianos prenilados e dolabelanos. Alguns desses compostos apresentam atividades como: antimicrobiana, citotóxica e antifúngica, além de atuarem no mecanismo de defesa das espécies produtoras e como marcadores ecológicos. A alga marinha *Dictyota mertensii*, coletada na praia de Flecheiras, Trairi-CE, foi submetida à extração com hexano, acetato de etila e etanol. Seus extratos foram cromatografados utilizando técnicas clássicas de cromatografias como: cromatografia sobre gel de sílica, cromatografia por exclusão molecular usando Sephadex® LH-20 e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A determinação estrutural dos compostos isolados envolveu o uso de técnicas espectroscópicas e espectrométricas, como: EM, RMN ^1H e ^{13}C , COSY, HMQC, HMBC e NOESY. A interpretação dos dados espectroscópicos, principalmente de RMN, culminou na identificação de cinco compostos, sendo dois sais de amônio e três diterpenos, dois dos quais de esqueleto guaiano e um dolabelano. Os compostos DM-01-04 foram enviados para realização de testes farmacológicos de viabilidade celular e inibição de produção de óxido nítrico. Com relação aos testes de viabilidade celular, os compostos de estrutura semelhantes DM-01 e DM-02 (sais quaternários de amônio) apresentaram citotoxicidade a partir da concentração de 12 μM , enquanto que a os compostos DM-03 e DM-04 a citotoxicidade foi observada a partir da concentração de 100 μM . No teste de inibição da produção de óxido nítrico, o composto DM-02 apresentou redução significativa na produção de ON a partir da concentração de 1,5 μM ,

enquanto os compostos DM-01, 03 e 04 apresentaram capacidade redutora a partir da concentração de 3 μM . O melhor efeito redutor foi observado nas concentrações de 50 μM dos compostos DM-03 e DM-04.

Palavras-chave: Produtos Naturais. *Dictyota mertensii*. Diterpenos.

ABSTRACT

The marine natural products represent a huge potential for the discovery of new drugs. Among the marine organisms producers of bioactive compounds appear the macroalgae, with highlighting for the brown algae, which includes ca. 1800 species distributed in 285 genera. These are producers of structurally diversified secondary metabolites which exhibit several biological and pharmacological activities. The Dictyota genus is known as a prolific source of secondary metabolites, especially of diterpenes such as xenicanes, prenylated guaianes and dolabellanes. Some of these compounds exhibit antimicrobial, cytotoxic and antifungal activities, as well as can act in the defense mechanism. The seaweed *Dictyota mertensii*, collected on the beach of Flecheiras, Trairi-CE, was subjected to extraction in the solvents: hexane, ethyl acetate and ethanol. These extracts were chromatographed using classical chromatography techniques such as: chromatography on silica gel, exclusion chromatography using Sephadex® LH-20 and high performance liquid chromatography (HPLC). The structures of the isolated compounds were made by interpretation of spectroscopic and spectrometric techniques, such as: MS, ^1H and ^{13}C NMR, COSY, HMQC, HMBC and NOESY. The interpretation of the spectroscopic data, mainly of ^1H and ^{13}C NMR data led to structure elucidation of five compounds, being two quaternary ammonium salts and three diterpenes, two of them with guaiane structure and one dolabellane. The compounds DM-01 to DM-04 were submitted to cell viability and inhibition of nitric oxide production activities. As regards, the cell viability assays of the compounds with similar structure DM-01 and DM-02 (quaternary ammonium salts) showed similar cytotoxicity from the concentration of 12 μM , while the compounds DM-03 and DM-04 showed cytotoxicity over the concentration of 100 μM . In the inhibition NO assays, compound DM-02 showed a significant reduction in NO production from the concentration of 1.5 μM , while DM-01, 03 and 04 compounds showed reductive capacity from the

concentration of 3 μM . The best reducing effect was observed at the concentrations of 50 μM of compounds DM-03 and DM-04.

Keywords: Natural products. *Dictyota mertensii*. Diterpenes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição de produtos naturais marinhos por filo.....	20
Figura 2 – Principais áreas de aplicação dos compostos obtidos de organismos marinhos no período de 1996-2016.....	20
Figura 3 – Compostos isolados de algas marinhas.....	22
Figura 4 – <i>Ulva rigida</i> C. Agardh.....	25
Figura 5 – <i>Corallina officinalis</i>	26
Figura 6 – <i>Macrocystis pyrifera</i>	27
Figura 7 – Cromatograma de isolamento de DM- 01, 02, 03 e BCC-P5.....	32
Figura 8 – Cromatograma de isolamento de DM-04Fonte: Própria autora.....	33
Figura 9 – Fluxograma do fracionamento da subfração EADMr-BC.....	33
Figura 10 – Cromatograma de isolamento de DM-05.....	34
Figura 11 – Fluxograma do Fracionamento da subfração EADMr-BF.....	35
Figura 12 – Espectro de RMN ¹ H de DM-01.....	39
Figura 13 – Espectro de RMN ¹³ C de DM-01.....	40
Figura 14 – Subestrutura de DM-01.....	41
Figura 15 – Espectro de massas do composto DM-01.....	41
Figura 16 – Proposta mecanística de fragmentação para DM-01.....	42
Figura 17 – Estrutura e principais correlações observadas no espectro 2D HMBC para DM-01.....	42
Figura 18 – Espectro de RMN ¹ H de DM-02.....	43
Figura 19 – Espectro de RMN ¹³ C de DM-02.....	44
Figura 20 – Subestrutura de DM-02.....	45
Figura 21 – Espectro de massas do composto DM-02.....	45
Figura 22 – Proposta macanística de fragmentação para DM-02.....	45
Figura 23 – Estrutura do composto DM-02.....	46
Figura 24 – Espectro de RMN ¹ H de DM-03.....	47
Figura 25 – Espectro de RMN ¹³ C de DM-03.....	48
Figura 26 – Estrutura e principais correlações observadas no espectro 2D HMBC para DM-03.....	50
Figura 27 – Espectro de massas do composto DM-03.....	50
Figura 28 – Proposta mecanística de fragmentação para DM-03.....	51
Figura 29 – Espectro de RMN ¹ H de DM-04.....	52
Figura 30 – Espectro de RMN ¹³ C de DM-04.....	52
Figura 31 – Estrutura do composto DM-04.....	54
Figura 32 – Espectro de RMN ¹ H de DM-05.....	55
Figura 33 – Espectro de RMN ¹³ C de DM-05.....	56
Figura 34 – Espectro de massas do composto DM-05.....	57
Figura 35 – Proposta mecanística de fragmentação para DM-05.....	57
Figura 36 – Estrutura e principais correlações observadas no espectro 2D HMBC para DM-05.....	58
Figura 37 – Perfil de viabilidade celular em células RAW 264.7 para DM- 01 e 02.....	59
Figura 38 – Perfil de viabilidade celular em células RAW 264.7 para DM- 03 e 04.....	60
Figura 39 – Atividade inibitória na produção de ON em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Marcadores quimiotaxonômicos que diferenciam as algas	24
Tabela 2 – Deslocamentos químicos observados para o composto DM-01 e suas principais correlações no HMQC e HMBC	40
Tabela 3 – Comparação dos deslocamentos químicos observados para DM-01 e DM-02	44
Tabela 4 – Deslocamentos químicos observados para o composto DM-03 e suas principais correlações no HMQC e HMBC	49
Tabela 5 – Comparação dos deslocamentos químicos observados para DM-03 e DM-04	53
Tabela 6 – Deslocamentos químicos observados para o composto DM-05 e suas principais correlações no HMQC e HMBC – Continua.....	56
Tabela 6 – Deslocamentos químicos observados para o composto DM-05 e suas principais correlações no HMBC – Continuação	57
Tabela 7 – Viabilidade celular em células RAW 264.7	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CC	Coluna Cromatográfica
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CG	Cromatografia Gasosa
CI_{50}	Concentração inibitória média de 50 % do efeito máximo
CLAE	Cromatografia Líquida e Alta Eficiência
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
DQOI	Departamento de Química Orgânica e Inorgânica
EADMr	Extrato Acetato de Etila de <i>Dictyota mertensii</i>
EM	Espectrometria de Massas
ESI+	<i>Eletrospray</i> no modo positivo
eV	Elétron-volt
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation (Correlação Heteronuclear de Múltiplas Ligações)
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Correlation (Correlação Quântica Múltipla Heteronuclear)
Hz	Hertz
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
IE	Impacto Eletrônico
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MeOD	Metanol deuterado

MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
ON	Óxido Nítrico
ppm	Partes por milhão
PTFE	Politetrafluoetileno
q	Quarteto
quint	Quinteto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
Sephadex	Separation Pharmacia Dextran
t	Tripleto
TFA	Ácido trifluoroacético
TOF	Time Of Flight (Tempo de Voo)
Tr	Tempo de retenção
UFLC	Ultra Fast Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida Ultra Rápida)
UI	Unidades internacionais
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência)
UV-Vis	Ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
Km	Quilômetro
Km ²	Quilômetros quadrados
φ	Diamêtro
m	Metro
μ	Micro (10 ⁻⁶)
η	Nano (10 ⁻⁹)
®	Marca registrada
mm	Milímetros (10 ⁻³ metros)
°C	Grau celsius
g	Gramas
L	Litro
δ	Deslocamento químico (ppm)
δ _H	Deslocamento de hidrogênio
δ _C	Deslocamento de carbono
λ _{máx}	(Lambda Máximo) Comprimento de onda de máxima absorção (nm)
[α] _D	(Alfa) Rotação específica
m/z	Razão massa/carga

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1. Considerações gerais sobre algas	23
2.2. Algas verdes	24
2.3. Algas vermelhas	25
2.4. Algas pardas	26
2.5. Considerações gerais sobre a Ordem Dictyotales, a família Dictyotaceae e o Gênero <i>Dictyota</i>	27
3. MATERIAIS	28
3.1. Métodos Cromatográficos	28
3.1.1. Cromatografia de Adsorção	28
3.1.2. Cromatografias de Exclusão	28
3.1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	29
3.2. Métodos Físicos	29
3.2.1. Rotação óptica	29
3.3. Métodos Espectroscópicos e Espectrométricos	29
3.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	29
3.3.2. Espectrometria de Massas (EM)	30
4. MÉTODOS	31
4.1. Coleta do material biológico	31
4.2. Preparação dos extratos	31
4.3. Fracionamento cromatográfico dos extratos acetato de etila e etanólico de <i>Dictyota mertensii</i>	31
4.3.1. Fracionamento cromatográfico da sufração EADMr-BC	32
4.3.2. Fracionamento cromatográfico da subfração EADMr-BF	34
4.4. Testes Farmacológicos	35
4.4.1. Cultura de Células	35
4.4.2. Ensaio de viabilidade celular em células RAW 264,7	35
4.4.3. Teste de inibição da produção de NO (óxido nítrico)	36
4.4.4. Análise Estatística	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1. Determinação estrutural dos compostos obtidos de <i>D. mertensii</i>	38

<i>5.1.1. Determinação estrutural de DM-01</i>	38
<i>5.1.2. Determinação estrutural de DM-02</i>	42
<i>5.1.3. Determinação estrutural de DM-03</i>	46
<i>5.1.4. Determinação estrutural de DM-04</i>	51
<i>5.1.5. Determinação estrutural de DM-05</i>	54
5.2. Ensaios farmacológicos	58
<i>5.2.1. Ensaios de viabilidade celular</i>	58
<i>5.2.2. Teste de inibição da produção de ON</i>	60
6. CONCLUSÃO	62
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE 1A – Espectro RMN ¹³C-APT do composto DM-01	67
APÊNDICE 1B – Espectro HMQC do composto DM-01	67
APÊNDICE 1C – Espectro HMBC do composto DM-01	68
APÊNDICE 2A – Espectro RMN ¹³C-APT do composto DM-02	68
APÊNDICE 2B – Espectro HMQC do composto DM-02	69
APÊNDICE 2C – Espectro HMBC do composto DM-02	69
APÊNDICE 3A – Espectro HMQC do composto DM-03	70
APÊNDICE 3B – Espectro HMBC do composto DM-03	70
APÊNDICE 4A – Espectro HMQC do composto DM-04	71
APÊNDICE 4B – Espectro HMBC do composto DM-04	71
APÊNDICE 5A – Espectro RMN ¹³C-APT do composto DM-05	72
APÊNDICE 5B – Espectro HMQC do composto DM-05	72
APÊNDICE 5C – Espectro HMBC do composto DM-05	73
APÊNDICE 6 – Diterpenos de esqueleto xenicano, guaiano e dolabelano	73

1. INTRODUÇÃO

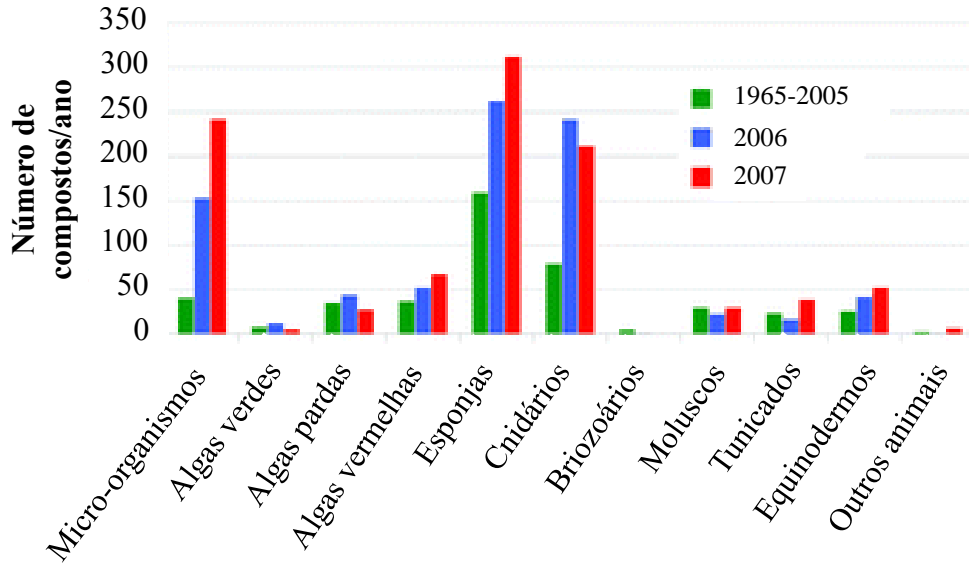
O ecossistema marinho abrange aproximadamente 71% da superfície terrestre e cerca de 97% da água do planeta, sendo o maior ambiente da biosfera (VIDAL, 2004). Nesse ecossistema, pode ser encontrado representantes de cerca de 34 dos 36 filos de animais, englobando mais de 250 mil espécies, representando cerca de 29% de toda a biodiversidade do planeta (MONTASER; LUESCH, 2011).

Considerados como o pulmão do mundo devido a marcante presença de organismos fotossintetizantes, os oceanos também são importantes fontes de obtenção de alimentos, vias de transporte e comércio, elementos de extração mineral, reguladores térmicos, geradores de energia e depósitos de carbono. (BARBIERI, 2004; GREENPEACE, 2009).

O litoral brasileiro tem cerca de 7.491 Km de extensão, podendo passar de 8.500 Km quando incluídas as reentrâncias litorâneas (VIDAL, 2004; CIA, 2018). Apresenta uma costa marinha com cerca de 3,5 milhões Km² que inclui ecossistemas como recifes de corais, dunas, manguezais, lagoas, estuários e pântanos (Ministério do Meio Ambiente, 2018).

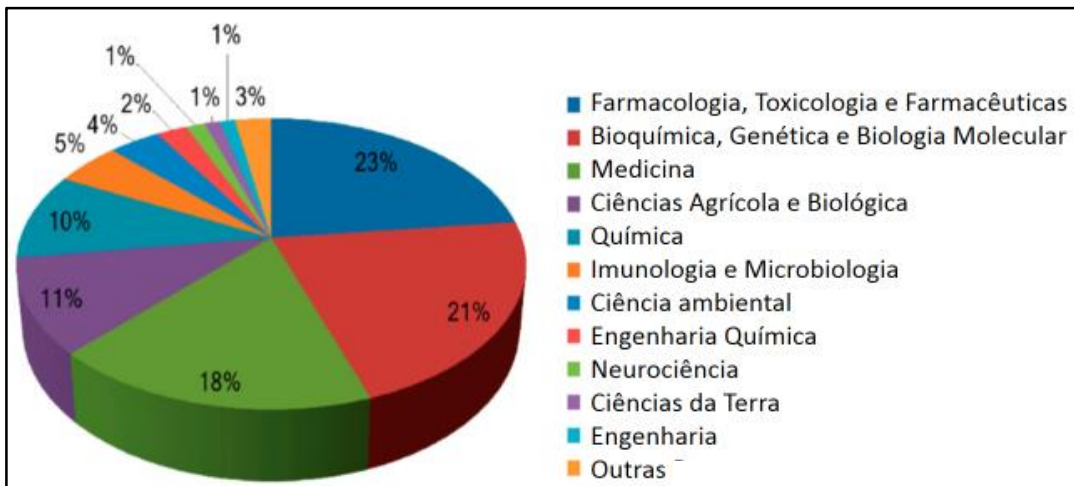
Nas últimas décadas o interesse pelos organismos marinhos vem crescendo de forma significativa, como pode ser visto na Figura 1, particularmente por serem fontes produtoras de metabólitos secundários bioativos (HADJU; PEIXINHO; FERNANDEZ, 2011) (Figura 2). Apesar desse crescente interesse, estima-se que menos de 3% do total de organismos marinhos conhecidos tenham sido estudados (LORENZO, 2010).

Figura 1 – Distribuição de produtos naturais marinhos por filo



Fonte: Adaptado de BLUNT *et al*, 2009.

Figura 2 – Principais áreas de aplicação dos compostos obtidos de organismos marinhos no período de 1996-2016



Fonte: adaptado de RUIZ-TORRE *et al*, 2017

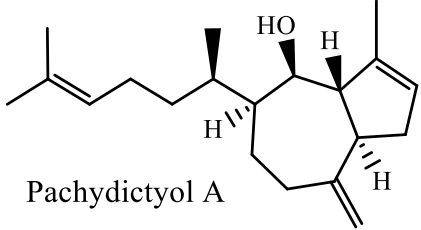
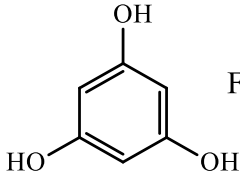
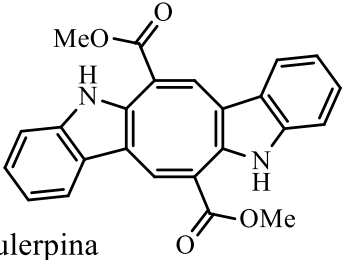
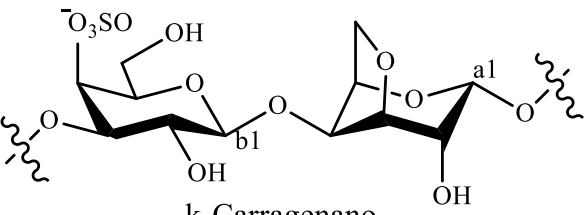
Dentre esses organismos, as algas marinhas constituem um grupo altamente diversificado de espécies fotossintetizantes. Sendo divididas em duas categorias: as microalgas e as macroalgas. As macroalgas são classificadas, principalmente, em pardas (*Phaeophyceae*), em vermelhas (*Rhodophyceae*), ou verdes

(*Chlorophyceae*), dependendo da sua composição nutricional e química (DAWCZYNSKI, SCHUBERT, JAHREIS, 2007).

Além da importância ecológica, muitas espécies de algas, especialmente as macroalgas, tem valor econômico, sendo bastante utilizadas como alimento, por exemplo: a Kombu (*Saccharina japonica*) e a Nori (algas vermelhas comestíveis do gênero *Porphyra*) que são utilizadas na preparação dos sushis por serem ricas em iodo, sais minerais e vitaminas do complexo B. São também utilizadas como fertilizantes devido a presença dos elementos nitrogênio e potássio em sua composição (LIMA, 2018); na indústria alimentícia e cosmética por produzirem polissacarídeos solúveis em água – ágar, carrageninas e alginatos – que podem atuar como agentes espessantes (AGUILERA-MORALES *et al.*, 2005); como biocombustíveis em decorrência do alto teor de óleo (ARESTA *et al.*, 2005); como biomarcadores de poluição (ALVAREZ; PEÑA, 2004); nas indústrias serigráficas e de filtros (REYNOL, 2010). São utilizadas ainda na indústria farmacêutica por biosintetizarem metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas.

Devido à grande gama de substâncias químicas bioativas produzidas pelas macroalgas e as inúmeras aplicações possíveis em diversos âmbitos, por exemplo os compostos mostrados na Figura 3, elas vêm atraindo cada vez mais a atenção da comunidade científica.

Figura 3 – Compostos isolados de algas marinhas

 <p>Pachydietyl A</p> <p>Isolado de algas pardas do gênero <i>Dictyota</i>. Apresenta atividade antitrombótica, inibe a replicação do vírus da imunodeficiência humana do tipo 1, etc (MOURA et al., 2014).</p>	 <p>Floroglucinol</p> <p>Derivados foram isolados de algas pardas do gênero <i>Zonaria</i> (BLACKMAN, ROGERS, VOLKMAN, 1988). Utilizado na síntese de medicamentos, por ser agente terapêutico em diversas linhagens de células (FERREIRA et al., 2018).</p>
 <p>Caulerpina</p> <p>Pigmento vermelho isolado, principalmente, de algas verdes do gênero <i>Caulerpa</i> (MAITI, THOMSON, 1977). Apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (SOUZA et al., 2009).</p>	 <p>k-Carragenano</p> <p>Carrageninas ou carragenanos são polissacarídeos coloidais extraídos de algas vermelhas, principalmente da espécie <i>Chondrus crispus</i>. São usados para gelificação de alimentos, na estabilização de emulsões em: cosméticos, tintas e preparações farmacêuticas (LEE, 2008).</p>

Fonte: Própria autora.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Considerações gerais sobre algas

O termo alga é utilizado para um grupo de organismos eucariontes autótrofos que não possuem um ancestral em comum, mas apresentam características semelhantes. As algas são divididas em dois grandes grupos: as microalgas e as macroalgas. Estes organismos podem ser unicelulares, multicelulares ou organizados em colônias; avasculares e com pouca diferenciação entre os tecidos, não possuem raízes, caules ou folhas verdadeiras (GAMAL, 2010).

A maioria são seres aquáticos, habitando tanto em águas doces como no mar, havendo poucas espécies terrestres. No meio aquático podem formar comunidades, como os fitoplânctons e fitobentos. Os fitoplânctons são formados por um grande número de microalgas livres que constituem a base da cadeia alimentar marinha. O grupo de microalgas mais comum é o das diatomáceas, mas em alguns ambientes, principalmente em águas doces, as clorofíceas ou cianofíceas podem ser dominantes. Entre as macroalgas, os fitobentos são as principais formas de comunidades que podem incluir ainda algumas microalgas, animais, areia e lama, sendo responsáveis pela produção primária de oxigênio, além de servirem como alimentos e na formação de recifes (CLASSIFICAÇÃO... 2010; SAHOO, SECKBACH, 2015).

A classificação mais atual das algas foi realizada em 2008, por Robert Edward Lee, que classificou as algas em dois grupos: o procariota que tem apenas uma divisão – as cianofíceas – e o eucariota, dividido em três subgrupos com base na natureza da membrana do cloroplasto. O grupo eucariota é formado majoritariamente por três classes de algas: *Chlorophyceae* (algas verdes); *Phaeophyceae* (algas pardas) e *Rhodophyceae* (algas vermelhas) (SAHOO, SECKBACH, 2015).

As diferenças entre as algas são evidentes quando são comparados os pigmentos fotossintéticos, os alimentos de reserva, a morfologia, as paredes celulares, a construção de flagelos e a história

evolutiva. As algas verdes, por exemplo, possuem as clorofilas-*a* e clorofilas-*b* como pigmentos mais abundantes e o amido como substância de reserva. As algas pardas possuem as clorofilas-*a*, clorofilas-*c* e carotenoides (fucoxantina) como pigmentos mais abundantes, enquanto a laminarina e o manitol são as substâncias de reserva. Ao passo que as algas vermelhas possuem as clorofilas-*a*, mas seu pigmento mais abundante é a ficoeritrina que confere a cor vermelha, e tem o amido como substância de reserva (LEE, 2008; TEIXEIRA, 2013).

Tabela 1 – Marcadores quimiotaxonômicos que diferenciam as algas

Algas	Verdes	Pardas	Vermelhas
Clorofilas	a,b	a, c ₁ , c ₂	a
Pigmento mais abundante	clorofilas	carotenoides (fucoxantina)	ficoeritrina
Substância de reserva	amido	laminarina e o manitol	amido

Fonte: adaptado de LEE, 2008; TEIXEIRA, 2013.

2.2. Algas verdes

As *Chlorophyceae* são consideradas o grupo de algas mais diversificado com mais de 7.500 espécies catalogadas. Têm o corpo simples, chamado de talo por não haver diferenciação entre os tecidos. Considerando os fatores: estruturas do corpo, *habitats*, natureza do pigmento fotossintetizante, alimento de reserva e método de reprodução, Lee (2008) dividiu essa classe em nove ordens: *Chaetophorales*, *Volvocales*, *Tetrasporales*, *Chlorellales*, *Oedogoniales*, *Chlorosarcinales*, *Sphaeropleales*, *Prasiolales* e *Trebouxiales* (SAHOO, SECKBACH, 2015).

Figura 4 – *Ulva rigida* C. Agardh

Fonte: PILLON, 2012

2.3. Algas vermelhas

As *Rhodophyceae*, também conhecidas como algas vermelhas, abrangem 6.500 – 10.000 espécies, sendo a maioria de ambiente marinho (SAHOO, SECKBACH, 2015). Embora algumas espécies pertencentes aos gêneros *Gigartina* e *Schizymenia* possam alcançar até um metro, as algas vermelhas não chegam a ser tão grandes se comparadas com algumas espécies de algas pardas. Baseado nas estruturas dos talos e nas mudanças pós-fertilização, Lee (2008), deixando de lado as ordens mais avançadas, subdividiu a classe *Rhodophyceae* em dez ordens: *Cyanidiales*, *Porphyridiales*, *Acrochaetales*, *Batrachospermales*, *Bangiales*, *Nemaliales*, *Corallinales*, *Gelidiales*, *Gracilariales* e *Ceramiales*. Algumas características são interessantes, por exemplo: algumas espécies se apresentam como parasitas, a *Polysiphonia lanosa* que tem como hospedeiro o *Ascophyllum nodosum* (alga parda) e a *Ceramium condicola* cujo hospedeiro é a *Codium fragile* (alga verde) (SAHOO, SECKBACH, 2015).

Figura 5 – *Corallina officinalis*

Fonte: POCKLINGTON, 2011

2.4. Algas pardas

As *Phaeophyceae* são conhecidas comumente como algas pardas. Apresentam cerca de 1800 espécies em 285 gêneros reconhecidos, sendo encontradas majoritariamente em ambientes marinhos. Algumas espécies podem ter talos ramificados e coloração marrom devido à fucoxantina, um carotenóide presente nos seus cloroplastos (REVIERS; ROUSSEAU; DRAISMA, 2007; SILBERFELD *et al.*, 2010).

Com o desenvolvimento e uso de novas tecnologias de sequenciamento de DNA, o conhecimento sobre as algas pardas, desde 2001, foi expandido significativamente, permitindo o desenvolvimento de uma classificações mais abrangente através da inclusão de novas hipóteses filogenéticas que consideram a história evolutiva das espécies, anteriormente classificadas, erroneamente, como uma única espécie. Lee (2008) dividiu as algas pardas em sete ordens: *Fucales*, *Laminariales* (*kelps*), *Ectocarpales*, *Desmarestiales*, *Cutleriales*, *Sphacelariales* e *Dictyotales* (SAHOO, SECKBACH, 2015).

Figura 6 – *Macrocystis pyrifera*

Fonte: INATURALIST, 2018

2.5. Considerações gerais sobre a Ordem Dictyotales, a família Dictyotaceae e o Gênero *Dictyota*

A alga parda *Dictyota mertensii* pertence a família Dictyotaceae da ordem das Dictyotales (classe das Phaeophyceae). Esta ordem é composta por aproximadamente 18 gêneros e cerca de 100 espécies. As algas pertencentes desta ordem apresentam preferência por águas marinhas mais quentes do que a maioria das algas pardas (VALLIM *et al.*, 2005).

A família Dictyotaceae, inseridas na ordem Dictyotales, apresenta inúmeros gêneros de algas pardas, incluindo o gênero *Dictyota*. Espécies deste gênero são comuns em águas tropicais e subtropicais e são conhecidas por serem fontes produtoras de uma enorme variedade de metabólitos secundários biologicamente ativos, especialmente diterpenos, cujas funções ecológicas ainda não são claramente definidas, mas sabe-se que apresentam atividades ecológicas, como antifeedant (inibidor de apetite, fagorepulsivo) e anti-incrustantes. Além disso muito destes metabólitos secundários exibem atividades biológicas, como citotóxica, antibacteriana e antiviral (CHENG *et al.*, 2014; OTHMANI *et al.*, 2013).

3. MATERIAIS

3.1. Métodos Cromatográficos

3.1.1. *Cromatografia de Adsorção*

Foram utilizados gel de sílica 60 da Merck ou da Vetec (ϕ 70-230 μm , cromatografia gravitacional e ϕ 230-400 μm , cromatografia em funil poroso). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras e as quantidades de gel de sílica utilizadas.

Para a cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica 60 (ϕ 5-40 ηm) sobre alumínio da Silicycle com indicador de fluorescência na faixa de 254 ηm . Os eluentes utilizados foram: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol puro ou misturas em proporções crescentes de polaridade. A revelação das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foi obtida por exposição à luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda 254 ηm , emitido por uma lâmpada modelo CN-15LM da Vilber Lourmat, e por imersão em solução de vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) {15,0 g de vanilina, 250 mL de etanol e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado} ou sulfato de cério { $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ } {12 mL de H_2SO_4 , 100 mL de H_2O destilada e uma ponta de espátula de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (~20 mg)}, seguido de aquecimento por exposição ao ar quente de soprador serigráfico Steinel HL 500.

3.1.2. *Cromatografias de Exclusão*

Os fracionamentos por cromatografia de exclusão (peneira molecular) foram efetuados em gel de dextrano reticulado (*Sephadex*[®] LH-20) da *Pharmacia Fine Chemicals*, utilizando diclorometano e metanol como fase móvel.

3.1.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em aparelho da marca SHIMADZU modelo UFLC, equipado com detector UV-Vis (arranjo diíodo) e um sistema de bomba ternário. Utilizou-se colunas de fase reversa, preenchidas com C-18 ou Fenil-hexil da marca *Phenomenex*®, possuindo as seguintes especificações: 2,5 x 250 mm, 5 µm (analítica) e 4,6 x 250 mm, 5 µm (semi-preparativa), mantidas em forno termostático a 35 °C. As amostras foram eluídas com água acidificada com ácido trifluoracético-TFA a 0,1 %, acetonitrila e metanol.

Os solventes empregados apresentaram grau de pureza CLAE (99.9 %) (metanol, acetonitrila-Tedia e H₂O-Milli-Q) e foram filtrados através de membranas de náilon com poros de 0,45 µm (Millipore). As amostras foram dissolvidas nas fases móveis empregadas em cada análise e filtradas em membrana de politetrafluoetileno (PTFE) com poros de 0,45 µm (Whatman).

3.2. Métodos Físicos

3.2.1. Rotação óptica

As rotações ópticas foram obtidas em polarímetro digital da Jasco P-2000 em temperaturas entre 20 °C e 23 °C, com concentração de aproximadamente 1,0 mg/mL de solvente. O solvente utilizado foi metanol em cubeta de 2,5 mm de diâmetro e 100 mm de comprimento.

3.3. Métodos Espectroscópicos e Espectrométricos

3.3.1. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e Carbono-13 (RMN ¹³C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Avance DRX-500 e DPX-300 equipados

com sonda de 5 mm, instalados no Centro Nordestino de Aplicação e Uso de Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), da Universidade Federal do Ceará. O equipamento opera na frequência de 500/300 MHz para núcleos de hidrogênio e 125/75 MHz para núcleos de carbono-13 e os espectros foram obtidos a temperaturas de 27 °C.

Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram: clorofórmio (CDCl_3) e metanol (MeOD).

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN ^1H pelo pico de hidrogênio pertencentes às moléculas residuais não deuteradas dos solventes utilizados na análise.

As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convecção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete), q (quarteto), quint (quinteto) e m (multiplete).

3.3.2. Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas de baixa resolução foram registrados em um espectrômetro CG-EM Shimadzu/QP2010, utilizando coluna capilar RTX 30 m x 0,25 mm de espessura de filme e gás hélio foi utilizado como o gás transportador. O método de ionização aplicado foi o de impacto eletrônico a 70 eV, pertencente à Central Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica (DQOI) da Universidade Federal do Ceará.

Os espectros de massa de alta resolução foram obtidos em espectrômetro Acquity UPLC equipado com fonte de ionização por *electrospray* e acoplado a um sistema do tipo quadrupolo/time of flight (TOF), da Waters, pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA).

4. MÉTODOS

4.1. Coleta do material biológico

As algas foram coletadas, no período de maré-baixa, na praia de Flecheiras (03°13'S; 39°16'O), no município de Trairi, localizado no litoral do estado do Ceará. A identificação foi realizada pelo Dr. Pedro Bastos de M. Carneiro, Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR).

4.2. Preparação dos extratos

As algas foram lavadas abundantemente com água corrente, seguidas por água destilada e secas à temperatura ambiente por três à cinco dias. Após esse período, os materiais secos foram triturados e submetidos a sucessivas extrações com os solventes orgânicos: hexano, acetato de etila e etanol (2 vezes cada solvente), seguidos pelo processo de evaporação dos solventes à pressão reduzida e baixa temperatura, resultando nos respectivos extratos brutos.

4.3. Fracionamento cromatográfico dos extratos acetato de etila e etanólico de *Dictyota mertensii*

O extrato acetato de etila e o extrato etanólico da alga parda *D. mertensii*, por serem semelhantes em CDD, foram reunidos (EADMr = 3,5 g) e submetidos a fracionamento cromatográfico em coluna aberta (CC). O extrato foi acondicionado sobre gel de sílica, utilizando a mistura binária dos solventes hexano e acetato de etila em gradiente de polaridade (100:0; 75:25; 50:50; 25:75; 0:100), seguido por metanol puro.

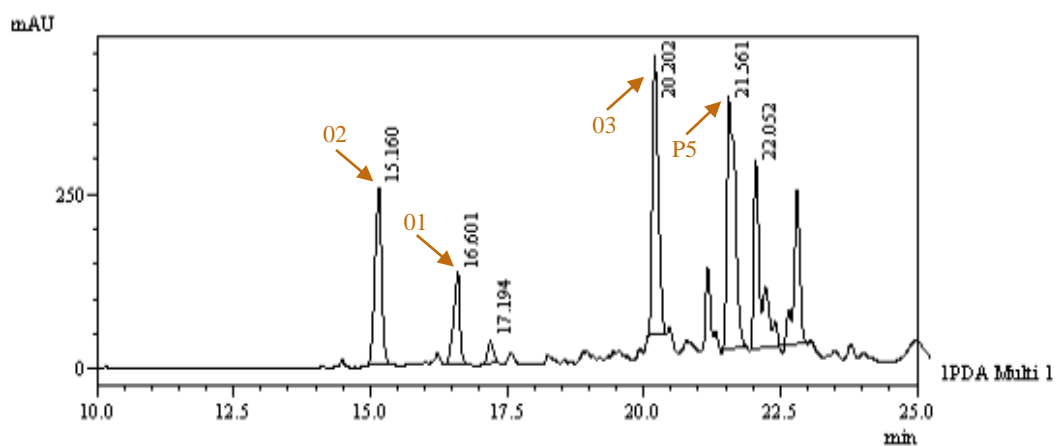
As frações obtidas, após analisadas por CCD, resultaram nos seguintes grupos de subfrações: EADMr- A (79,1 mg), B (2,0 g), C (629,5 mg), D (128,5 mg), E (83,4 mg), F (651,1 mg). A subfração EADMr-B (2,0 g) foi submetido a fracionamento cromatográfico em CC, utilizando a mistura binária dos solventes hexano e acetato de etila em gradiente de

polaridade (100:0; 90:10; 80:20; 70:30; 60:40; 50:50; 25:75; 0:100), seguido por metanol puro. Estas frações, após analisadas por CCD, resultaram em 11 subfrações EADMr-B (A-K), sendo as subfrações EADMr-BC (343,5 mg) e EADMr-BF (214,5 mg) as mais promissoras, por apresentarem um maior número de compostos.

4.3.1. Fracionamento cromatográfico da subfração EADMr-BC

A subfração EADMr-BC foi dissolvida em metanol e submetida a fracionamento cromatográfico sobre Sephadex LH-20, utilizou-se metanol como eluente, resultando em 3 subfrações: EADMr-BC (A-C), dos quais a subfração EADMr-BCC (222,0 mg) teve seus compostos purificados por CLAE (Figura 9), utilizando coluna de fase-reversa fenil-hexil, na faixa de UV de 210-400, em gradiente composto por H₂O (0,1 % TFA)/MeOH 55-100 % em 15 minutos, seguidos por 10 minutos em metanol, com fluxo de 3 mL/min e volume de injeção de 190 µL, resultando em 4 picos: BCC-P1 (17,0 mg), codificados como DM-02, BCC-P2 (9,1 mg), codificados como DM-01, BCC-P3 (2,9 mg), BCC-P4 (7,6 mg), codificado como DM-03 e 2 faixas: BCC-P5 (53,7 mg) (t_R : 21,45-21,80) e BCC-P6 (90,4 mg) (t_R : 22,00-22,95) (Figura 7).

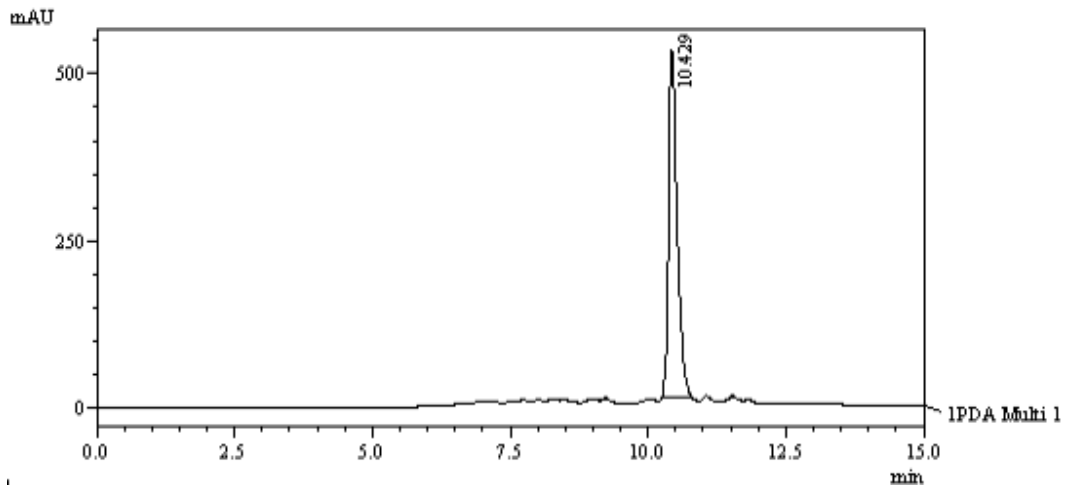
Figura 7 – Cromatograma de isolamento de DM- 01, 02, 03 e BCC-P5



Fonte: Própria autora.

A faixa BCC-P5 foi recromatografada por CLAE, utilizando coluna de fase-reversa fenil-hexil em gradiente composto por H₂O (0,1 % TFA)/MeOH 85-100 % em 5 minutos, seguidos por 15 minutos com metanol puro, com fluxo de 3 mL/min e volume de injeção de 190 µL, e resultou em um pico BCC-P5-P1, codificado como DM-04, (7,4 mg), Figura 8.

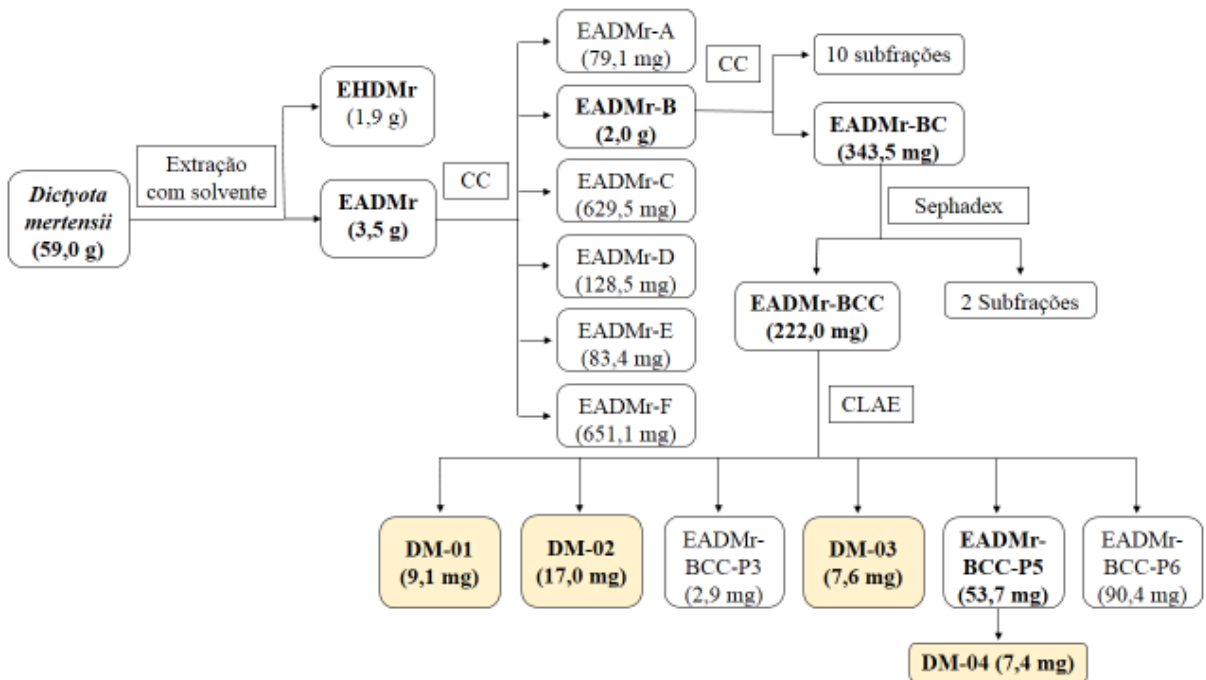
Figura 8 – Cromatograma de isolamento de DM-04



Fonte:

Própria autora.

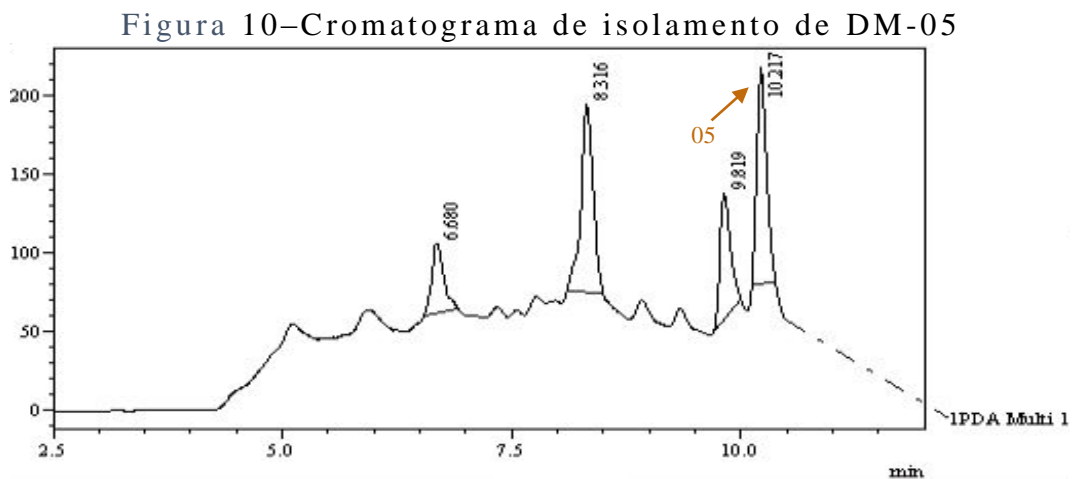
Figura 9 – Fluxograma do fracionamento da subfração EADMr-BC



Fonte: Própria autora.

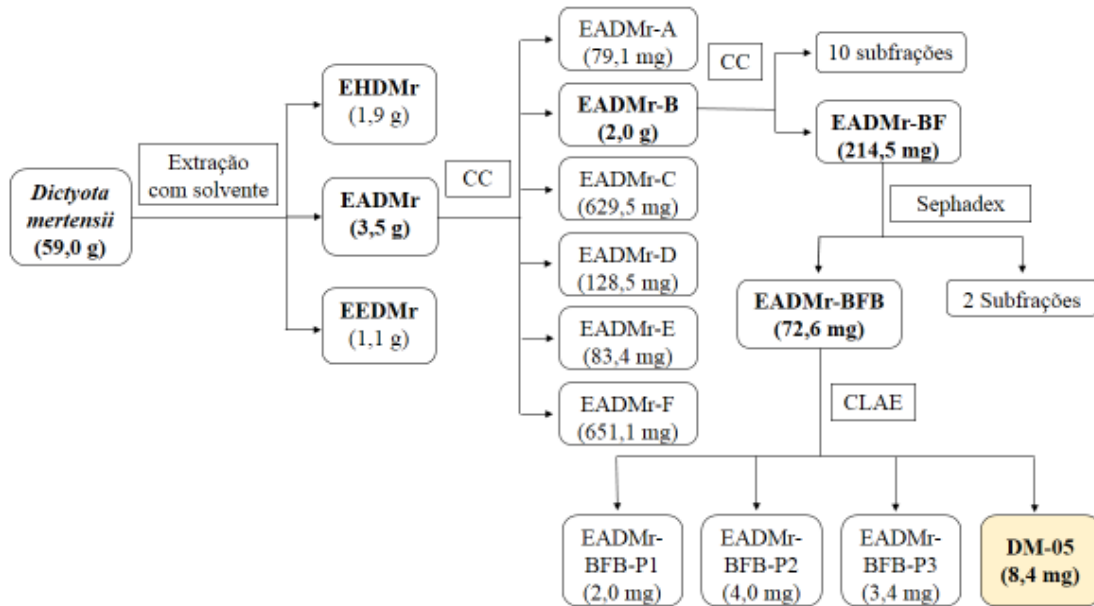
4.3.2. Fracionamento cromatográfico da subfração EADMr-BF

A subfração EADMr-BF foi dissolvida em metanol e submetida a fracionamento cromatográfico sobre Sephadex LH-20 eluída com metanol, resultando em 3 subfrações: EADMr-BF (A-C). A subfração EADMr-BFB (72,6 mg) foi submetida a CLAE (Figura 11), utilizando coluna de fase-reversa C-18, na faixa de UV de 210-400, em gradiente composto por H₂O (0,1 % TFA)/MeOH 85-100 % em 5 minutos, seguidos por 15 minutos com metanol puro, com fluxo de 3 mL/min e volume de injeção de 190 µL, resultando em 4 picos: BFB-P1 (2,0 mg), BFB-P2 (4,0 mg), BFB-P3 (3,4 mg) e BFB-P4 (8,4 mg), codificado como DM-05 (Figura 10).



Fonte: Própria autora.

Figura 11 – Fluxograma do Fracionamento da subfração EADMr-BF



Fonte: Própria autora.

4.4. Testes Farmacológicos

Estes ensaios foram realizados no Laboratório de Produtos Naturais (Dept. de Fisiologia e Farmacologia), sob coordenação da Profa. Dra. Flávia Almeida Santos.

4.4.1. Cultura de Células

Células RAW 264,7 (ATCC® TIB-71) foram cultivadas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 100 UI/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, a 37 °C, em 5 % de CO₂ e 95 % de humidade.

4.4.2. Ensaio de viabilidade celular em células RAW 264,7

Células RAW 264.7 foram plaqueadas em microplaca de 96 poços, com densidade populacional de 1×10^5 células/poço e incubadas por 24 horas. As células foram pré-tratadas com os compostos DM- 01, 02, 03 e

04 (12 – 200 μM) e Tx-100 (padrão citotóxico) por 24 h. Ao término deste período, foi adicionado MTT (1 mg/mL), em cada poço, e após 4 horas o meio foi removido e DMSO (100 μL) foi adicionado.

A leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (Asys UVM 340, Biochrom, USA), em comprimento de onda de 570 nm. Os resultados são expressos em percentuais de viabilidade celular em relação ao grupo controle (100% de viabilidade). A CI_{50} (concentração inibitória média de 50 % do Efeito Máximo) foi calculada a partir das curvas de concentração-resposta e os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independentes que foram realizados em triplicata.

4.4.3. Teste de inibição da produção de NO (óxido nítrico)

Células RAW 264.7 foram plaqueadas em microplaca de 48 poços com densidade populacional de 5×10^5 células/poço e incubadas por 24 horas. As células foram pré-tratadas com os compostos DM- 01, 02, 03 e 04 (12 – 200 μM) por 1 h. Após o período de incubação as células foram submetidas ao estímulo com LPS (1 $\mu\text{g/mL}$) a 37 °C por 24 h. 100 μL de sobrenadante foi adicionado a 100 μL de reagente de Griess (1 % de sulmanilamida, 0,1 % Dicloridrato de *N*-[1-naftil]-etilenodiamina, 5 % de ácido fosfórico) em microplaca de 96 poços para leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Dexametasona (4 μM) foi utilizada como padrão e a quantificação do nitrito foi calculada a partir da curva padrão de nitrito de sódio. Os resultados foram obtidos a partir de três experimentos independente em triplicata.

4.4.4. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0 (USA). Os resultados da CI_{50} foram expressos como média \pm desvio padrão da média, enquanto as porcentagens de viabilidade foram expressas como média \pm erro padrão da média e a comparação entre as médias foi realizada utilizando análise de variância (ANOVA) seguida

pelo Teste de Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

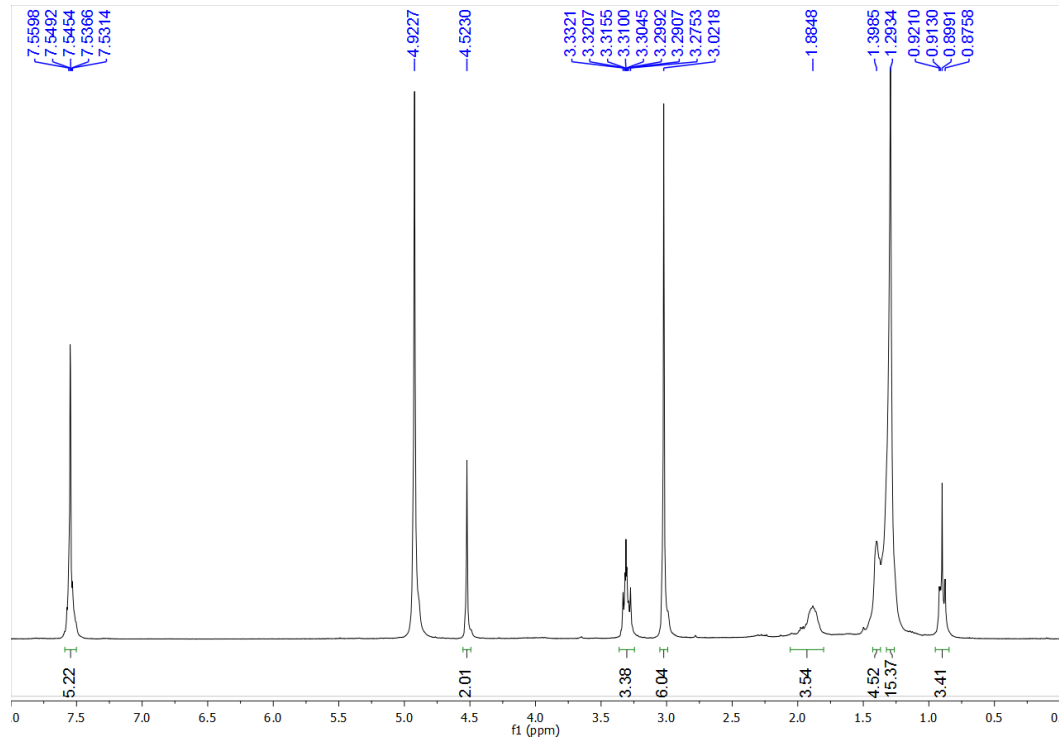
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Determinação estrutural dos compostos obtidos de *D. mertensii*

A partir do extrato acetato de etila de *D. mertensii* foram isolados 5 compostos designados como DM-02 (BCC-P1), DM-01 (BCC-P2), DM-03 (BCC-P4), DM-04 (BCC-P5) e DM-05 (BFB-P4). A determinação estrutural destes compostos envolveu a interpretação de métodos espectroscópicos como RMN ^1H , RMN ^{13}C e espectrométricos, EM.

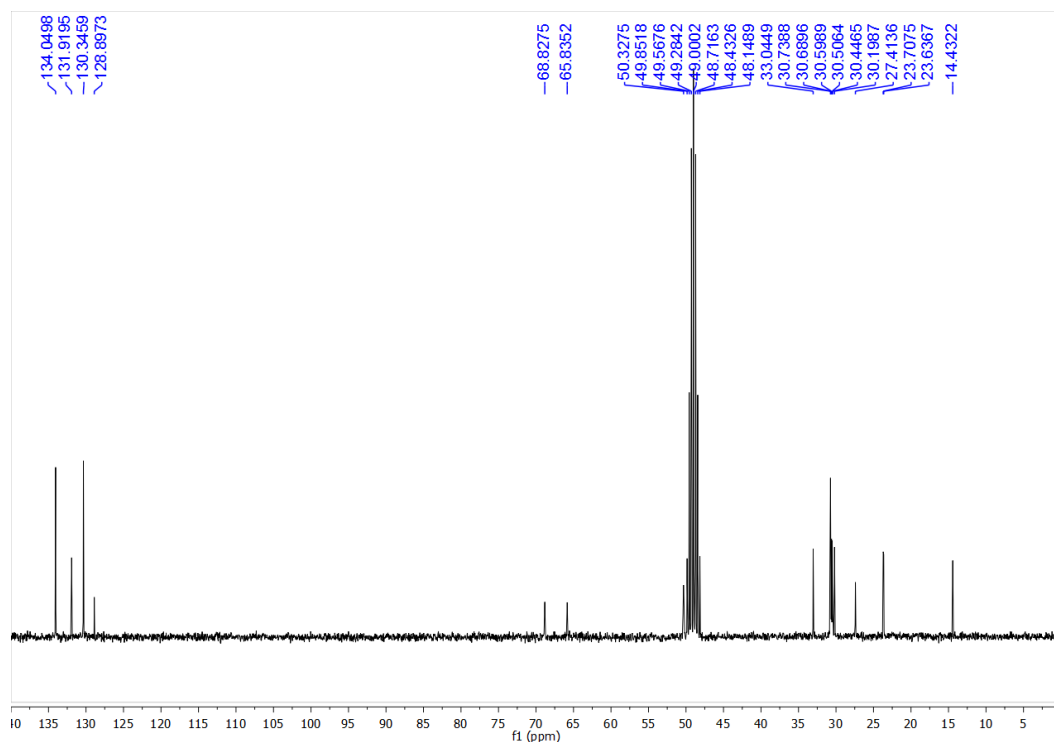
5.1.1. Determinação estrutural de DM-01

O composto DM-01 (uma resina amarelada, apresentando $[\alpha]_{\text{D}}^{21} +58,23$ e UV(MeOH) $\lambda_{\text{máx}} 208 \text{ nm}$) foi isolado a partir do extrato acetato de etila utilizando CLAE. Seu espectro de RMN ^1H (Figura 12) mostrou um em δH 4,52 (s) e 3,27 (t) compatíveis com hidrogênios metilênicos ligados a átomo de nitrogênio ou oxigênio. Adicionalmente, mostrou um singlete intenso em δH 3,02 com integração para seis átomos de hidrogênio correspondente à duas metilas ligadas ao nitrogênio, bem como sinais na faixa de δH 1,84 à 1,29 correspondentes a uma série de hidrogênios metilênicos e um sinal em δH 0,89 (t) indicando uma metila terminal.

Figura 12 – Espectro de RMN ^1H de DM-01

Fonte: Própria autora.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 13) apresentou catorze linhas espectrais cujo padrão de hidrogenação dos carbonos foram classificados através do espectro de RMN ^{13}C -APT (Apêndice 1A) como: três metilas, cinco metilênicos, incluindo uma série de sinais em sobreposição, três metínicos, dois dos quais correspondem a dois carbonos magneticamente equivalentes e um carbono não-hidrogenado, conforme apresentado na Tabela 2.

Figura 13 – Espectro de RMN ^{13}C de DM-01

Fonte: Própria autora.

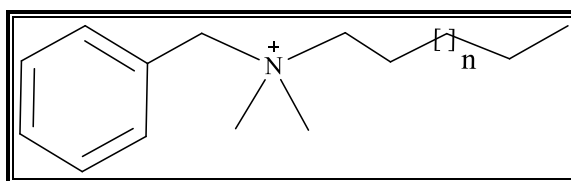
Tabela 2 – Deslocamentos químicos observados para o composto DM-01 e suas principais correlações no HMQC e HMBC

	DM-01			
	HMQC (Apêndice 1B)		HMBC (Apêndice 1C)	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3\text{-}^4J_{\text{CH}}$
C				
1	128,9	-	H-7; H-6	-
CH				
2/6	134,0	7,54 (m, 5H)	-	H-7
4	131,9	7,54 (m, 5H)	-	-
3/5	130,3	7,54 (m, 5H)	-	-
CH₂				
7	68,8	4,52 (s, 2H)	-	H-6; H-8; H-9
1'	65,8	3,27 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H)	-	H-7; H-8; H-9
2'	23,6	1,88 (s, 2H)	H-1'	-
3'–11'	30,7 – 27,4	1,39 – 1,29 (m, 20H)	-	-
12'	33,0	1,39 – 1,29 (m, 20H)	-	H-14'
13'	23,6	1,88 (m, 2H)	H-14'	-
CH₃				
8	50,3	3,02 (s, 3H)	-	H-7; H-1'; H-9
9	49,8	3,02 (s, 3H)	-	H-7; H-1'; H-8
14'	14,4	0,90 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H)	-	-

Fonte: Própria autora.

Através da teoria do deslocamento (SILVERSTEIN, 1994) químico foi possível diferenciar os sinais de carbono correspondentes a um anel aromático (δC 134,0 a 128,0); dois carbonos metilênicos ligados a nitrogênio ou oxigênio (δC 68,8 e δC 65,8); bem como duas metilas, ambas ligadas a nitrogênio (δC 50,3 e δC 49,8). Com isso chegou-se a subestrutura representada na Figura 14.

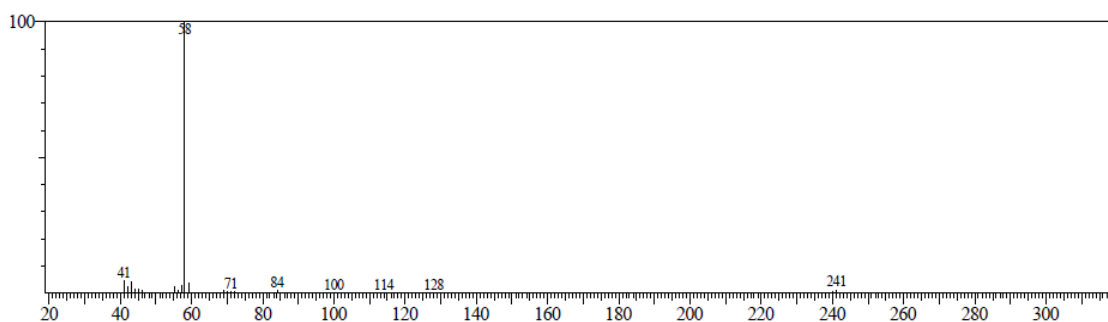
Figura 14 – Subestrutura de DM-01



Fonte: Própria autora.

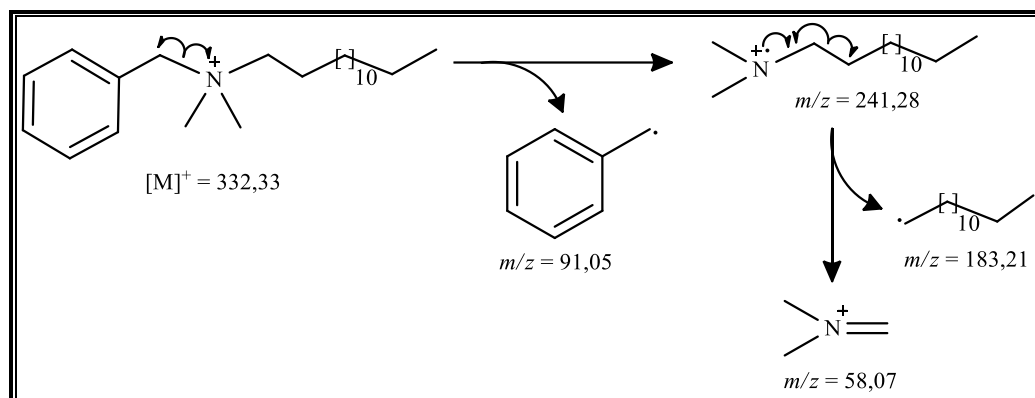
O espectro de massas obtido por impacto eletrônico (IE) (70 eV) do composto DM-01 (Figura 15) apresentou dois importantes fragmentos: um com $m/z = 241$ u.m.a correspondente à cadeia *N,N*-dimetil-tetradecano-1-amino justificado pela perda do radical benzila, e outro com $m/z = 58$ u.m.a (pico base) correspondente à unidade *N,N*-dimetil-metanamina formado pela perda do radical tridecano, Figura 16.

Figura 15 – Espectro de massas do composto DM-01



Fonte: Própria autora.

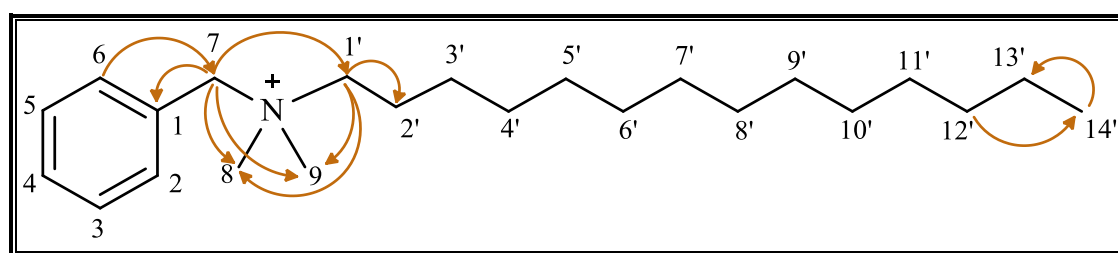
Figura 16 – Proposta mecanística de fragmentação para DM-01



Fonte: Própria autora.

A partir dessas informações chegou-se à fórmula molecular $C_{23}H_{42}N^+$ ($m/z = 332$) possibilitando determinar o tamanho da cadeia hidrocarbônica (C_{14}) (Figura 17). Conforme pesquisas realizadas em literatura científica, os sais quaternários de amônio são importantes em formulações de desinfetantes e cosméticos devido às suas propriedades surfactantes, emulsificante, bactericidas, etc. (QUATERNÁRIO, 2018)

Figura 17 – Estrutura e principais correlações observadas no espectro 2D HMBC para DM-01



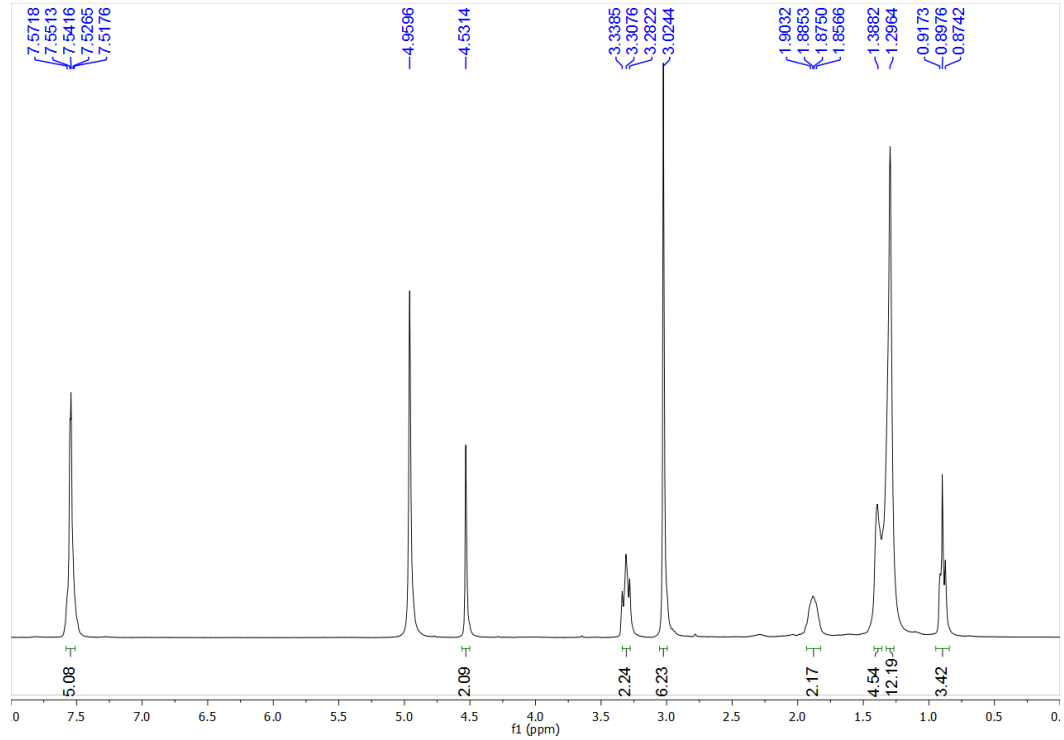
Fonte: Própria autora.

5.1.2. Determinação estrutural de DM-02

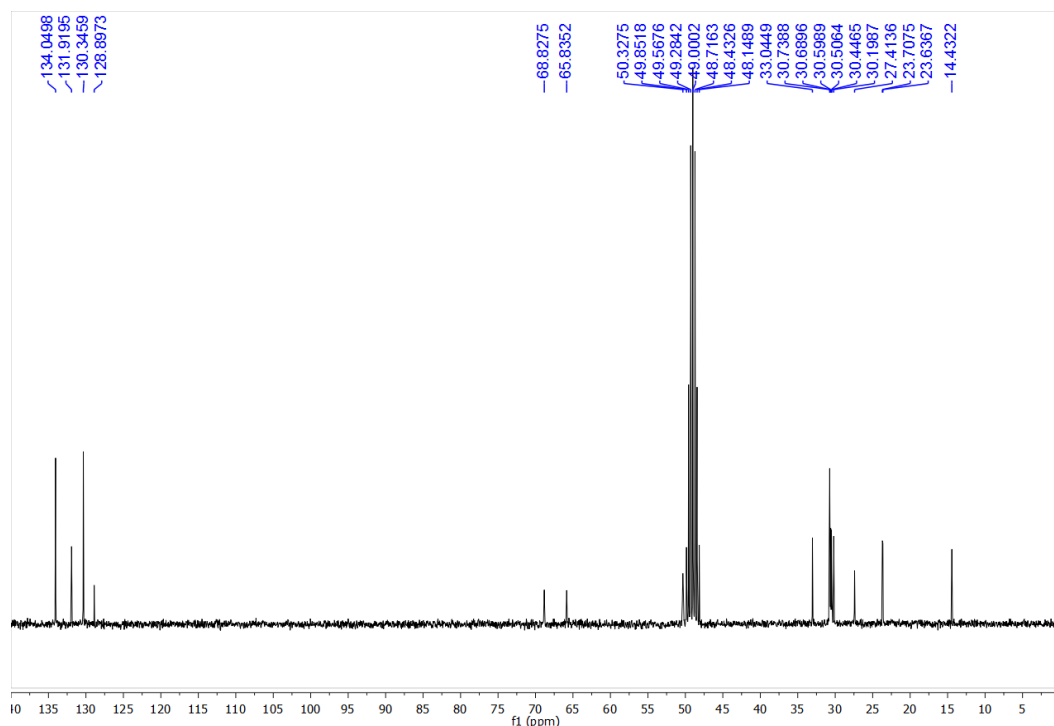
O composto DM-02 (uma resina amarelada apresentando $[\alpha]_D^{21} +56,30$ e UV(MeOH) $\lambda_{m\acute{a}x}$ 208 nm) foi isolado por CLAE. Sua estrutura foi determinada através de comparação de seus dados espectroscópicos e espectrométricos, com os dados do composto DM-01, visto que seus espectros eram bastante semelhantes (Tabela 3). No apêndice encontram-

se os espectros de RMN APT (Apêndice 2A), HMQC (Apêndice 2B), e HMBC (Apêndice 2C) do composto DM-02.

Figura 18 – Espectro de RMN ^1H de DM-02



Fonte: Própria autora.

Figura 19 – Espectro de RMN ^{13}C de DM-02

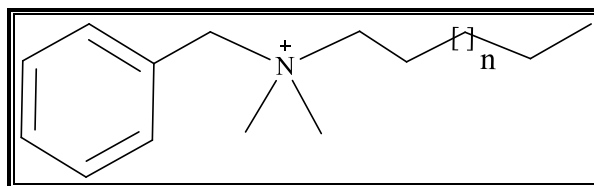
Fonte: Própria autora.

Tabela 3 – Comparação dos deslocamentos químicos observados para DM-01 e DM-02

DM-02	δ_{C}	δ_{H}	DM-01	δ_{C}	δ_{H}
C			C		
1	128,8	-	1	128,9	-
CH			CH		
2/6	134,0	7,57 (m, 5H)	2/6	134,0	7,54 (m, 5H)
4	131,9	7,57 (m, 5H)	4	131,9	7,54 (m, 5H)
3/5	130,3	7,57 (m, 5H)	3/5	130,3	7,54 (m, 5H)
CH₂			CH₂		
7	68,8	4,53 (s, 2H)	7	68,8	4,52 (s, 2H)
1'	65,8	3,33 (t, $J = 8,0-7,6$ Hz, 2H)	1'	65,8	3,27 (t, $J = 7,2$ Hz, 2H)
2'	23,7	1,90 (s largo, 2H)	2'	23,6	1,88 (s, 2H)
3'	30,7 – 27,4	1,38 (s, 2H)	3'-11'	30,7 – 27,4	1,39 – 1,29 (m, 20H)
4'-9'	30,7 – 27,4	1,29 (s, 12H)	12'	33,0	1,39 – 1,29 (m, 20H)
10'	33,0	1,38 (s, 2H)	13'	23,6	1,88 (m, 2H)
11'	23,6	1,77 (s largo, 2H)	-	-	-
CH₃			CH₃		
8/9	50,3	3,02 (s, 6H)	8	50,3	3,02 (s, 3H)
12'	14,4	0,91 (t, $J = 5,9-6,6$ Hz, 3H)	9	49,8	3,02 (s, 3H)
-	-	-	14'	14,4	0,90 (t, $J = 6,9$ Hz, 3H)

Fonte: Própria autora.

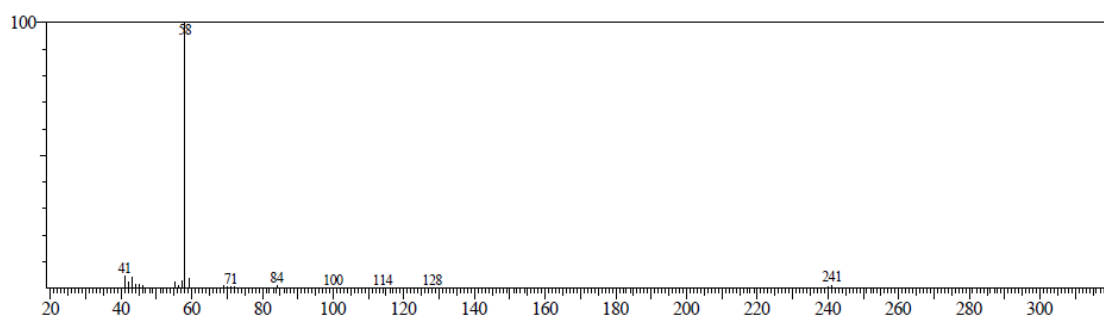
Figura 20 – Subestrutura de DM-02



Fonte: Própria autora.

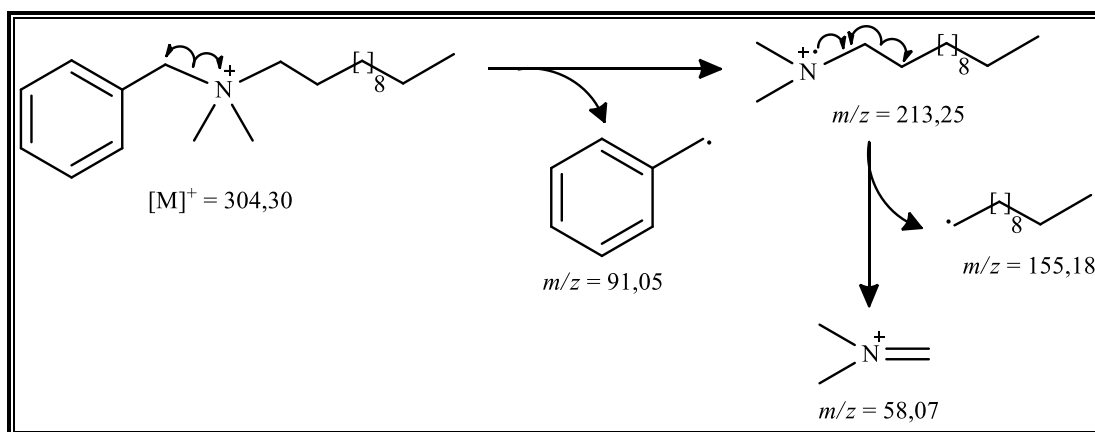
De forma semelhante ao composto DM-01, o espectro de massas obtido por IE (70 eV) do composto DM-02 (Figura 21) apresentou dois fragmentos que justificavam o tamanho da cadeia. O pico com $m/z = 213$ u.m.a corresponde à cadeia *N,N*-dimetil-dodecano-1-amino justificado pela perda do radical benzila, enquanto o pico com $m/z = 58$ u.m.a (pico base) indicou uma unidade *N,N*-dimetil-metanamina, a qual foi formado pela perda do radical undecano, Figura 22.

Figura 21 – Espectro de massas do composto DM-02



Fonte: Própria autora.

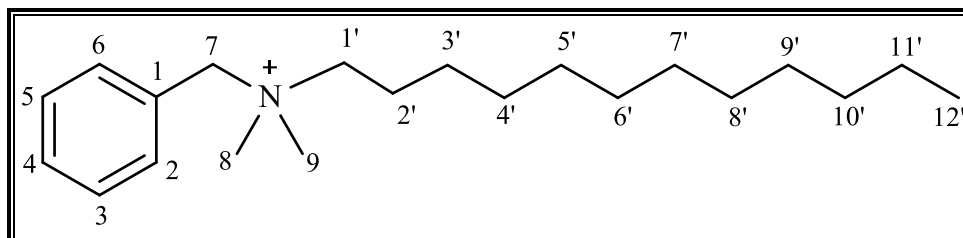
Figura 22 – Proposta mecanística de fragmentação para DM-02



Fonte: Própria autora.

A partir dessas informações chegou-se na fórmula molecular $C_{21}H_{38}N^+$ ($m/z = 304$) com cadeia hidrocarbônica C_{12} (Figura 23).

Figura 23 – Estrutura do composto DM-02



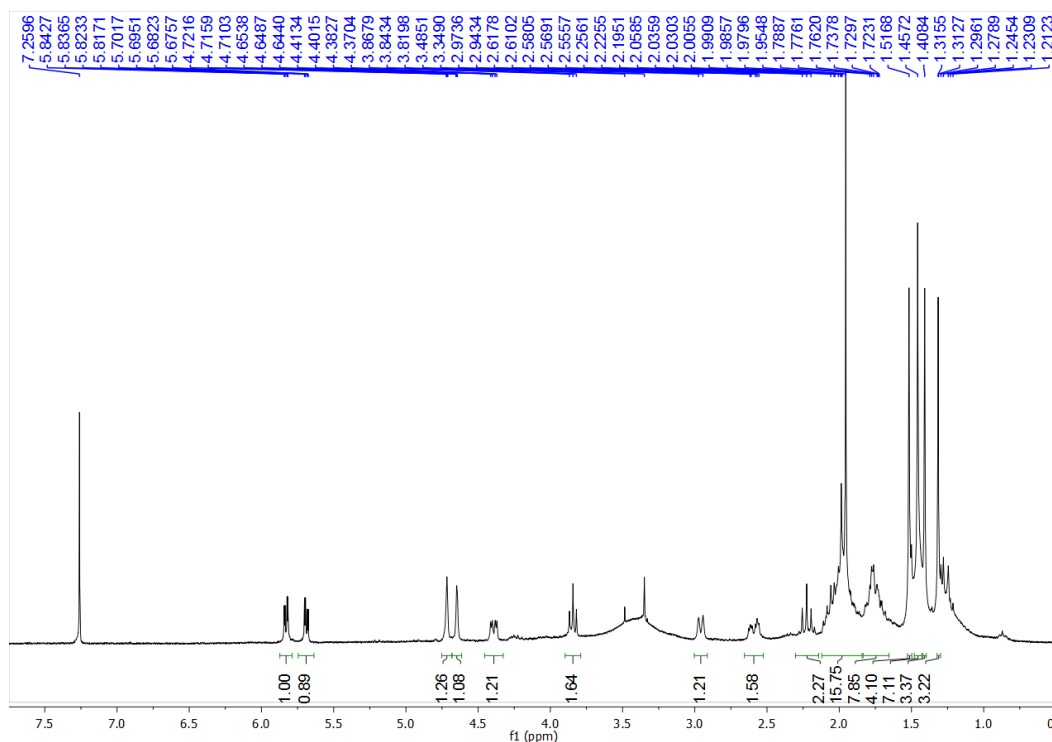
Fonte: Própria autora.

5.1.3. Determinação estrutural de DM-03

O composto DM-03 (uma resina amarelada apresentando $[\alpha]_D^{20} +65,76$ e UV(MeOH) $\lambda_{m\acute{a}x}$ 199 nm) foi isolado a partir do extrato acetato de etila de *D. mertensii*.

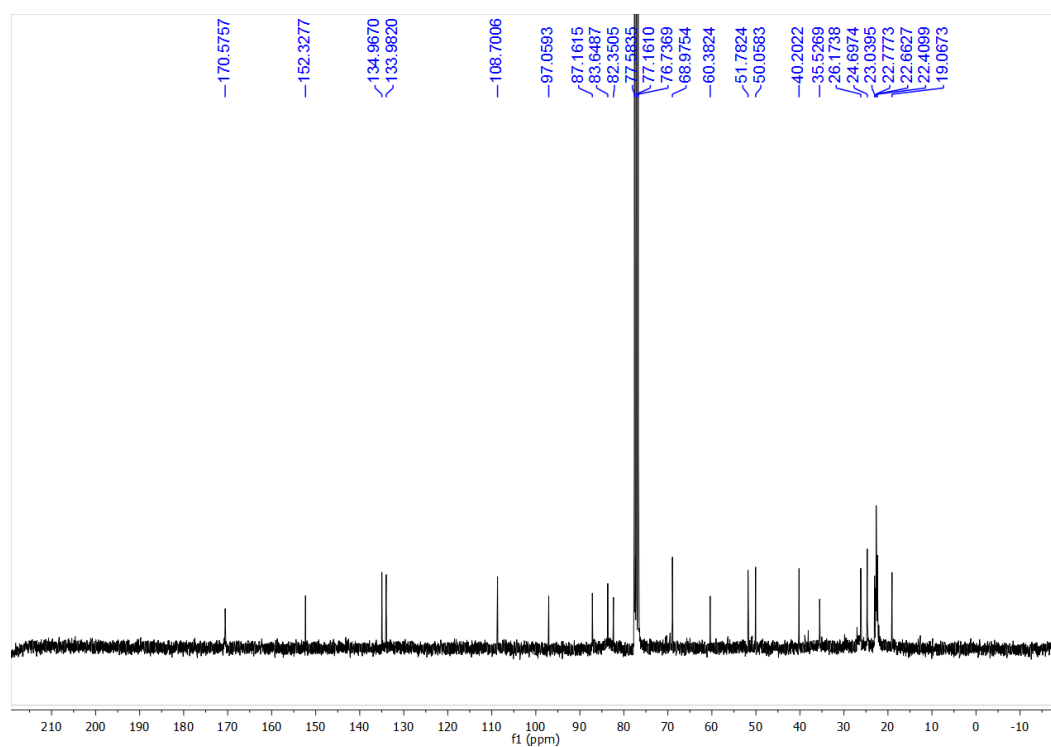
A análise do espectro de RMN 1H (Figura 24) apresentou sinais para hidrogênios olefínicos em δ_H 5,82 (dd, $J = 5,8; 1,8$, H-3) e 5,68 (dd, $J = 5,8; 1,8$, H-2) para uma dupla ligação com configuração *cis*, bem como sinais em δ_H 4,70 e 4,63 (s, 2H-18) compatíveis com hidrogênios de uma dupla ligação exocíclica.

Apresentou sinais em δ_H 3,84 (t, H-14) e 4,39 (dd, H-6) correspondentes a hidrogênios oximetínicos, sinais na faixa de δ_H 2,59 a 1,72 para hidrogênios metilênicos, assim como sinais para cinco metilas na faixa de δ_H 1,30 a 1,94, incluindo uma de um grupo acetil em δ_H 1,94.

Figura 24 – Espectro de RMN ^1H de DM-03

Fonte: Própria autora.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 25) apresentou vinte e dois sinais de carbonos, compatíveis para moléculas da classe dos diterpenos (20 carbonos), amplamente isolados de algas da família das Dictyotaceae, sendo os diterpenos de esqueleto xenicano, guaiano e dolabelano (Apêndice 6), os mais comuns (DE PAULA; VALLIM; TEIXEIRA, 2011; VALLIM *et al.*, 2005; CHENG *et al.*, 2014). Os sinais observados para os carbonos em δ_{C} 152,0; 108,0; 69,0 e 51,8 são comumente associados à diterpenos de esqueleto guaiano prenilados (CHENG *et al.*, 2014; OTHMANI *et al.*, 2013).

Figura 25 – Espectro de RMN ^{13}C de DM-03

Fonte: Própria autora.

Com o auxílio do espectro de RMN 2D HMQC (Apêndice 3A), o padrão de hidrogenação de cada carbono foi determinado como: cinco carbonos metílicos, cinco metilênicos e sete metínicos. Os carbonos não-hidrogenados foram determinados através da subtração entre os espectros de ^{13}C e RMN HMQC (conforme apresentado na Tabela 4).

Tabela 4 – Deslocamentos químicos observados para o composto DM-03 e suas principais correlações no HMQC e HMBC

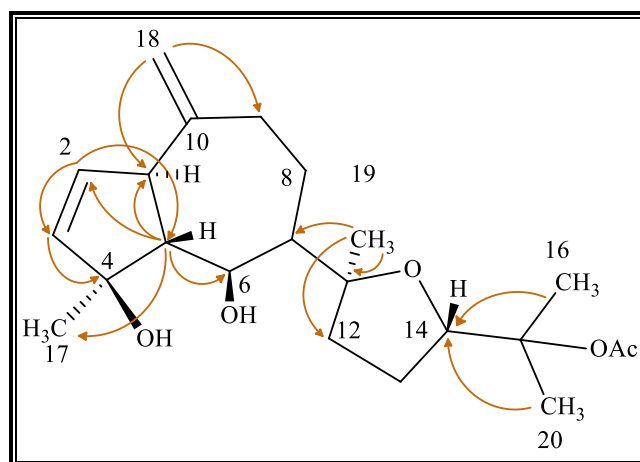
	DM-03			
	HMQC		HMBC	
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3-^4J_{CH}$
C				
4	97,0	-	H-3; H-5	-
10	152,3	-	-	H-5
11	87,1	-	H-19	-
15	82,3	-	H-16; H-20	-
15'-OAc	170,5	-	H-COOMe	-
CH				
1	50,0	2,97 (d, $J = 9,0$)	H-2; H-5	H-3; H-18
2	133,9	5,84 (dd, $J = 5,8; 1,8$)	H-3	-
3	134,9	5,82 (dd, $J = 5,8; 1,8$)	H-2	-
5	60,3	2,25 (t, $J = 9,1$)	-	H-2; H-3
6	68,9	4,40 (dd, $J = 9,0; 3,2$)	H-5	-
7	51,7	1,78 (m)	-	H-19
14	83,6	3,84 (t, $J = 7,3$)	-	H-16; H-20
CH₂				
8	23,0	1,77 (m)	-	-
9	40,2	2,07 (m); 2,61 (m)	-	H-10
12	35,5	1,72 (m); 2,05 (m)	-	H-19
13	26,1	1,98 (m)	-	-
18	108,7	4,64 (s); 4,71 (s)	-	-
CH₃				
16	22,6*	1,51 (s)	-	-
17	22,7*	1,45 (s)	-	H-5
19	24,6	1,31 (s)	-	-
20	19,0	1,40 (s)	-	-
15'-COOMe	22,4*	1,95 (s)	-	-

Fonte: Própria autora.

*Os valores podem se interconverter

A comparação dos dados de RMN ^{13}C obtidos para DM-03 e compostos já isolados de esqueletos guaianos de espécies do gênero *Dictyota* se mostraram semelhantes. A partir do espectro bidimensional HMBC (Apêndice 3B) pode-se confirmar, através das correlações observadas na Figura 26, que a molécula em questão tratava-se de um diterpeno guaiano prenilado.

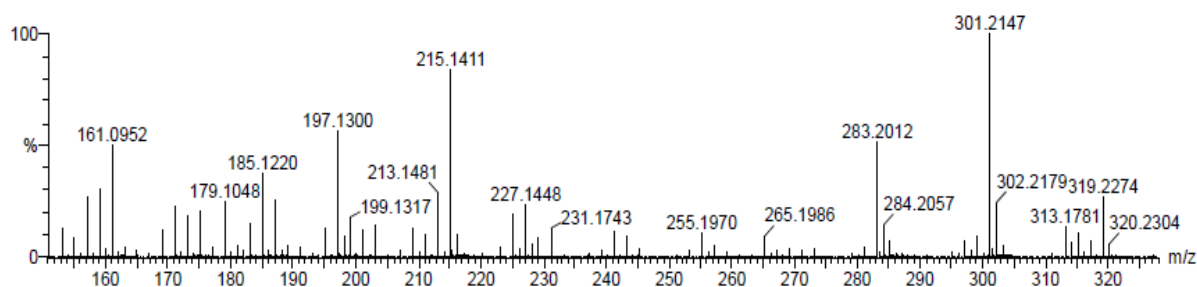
Figura 26 – Estrutura e principais correlações observadas no espectro 2D HMBC para DM-03



Fonte: Própria autora.

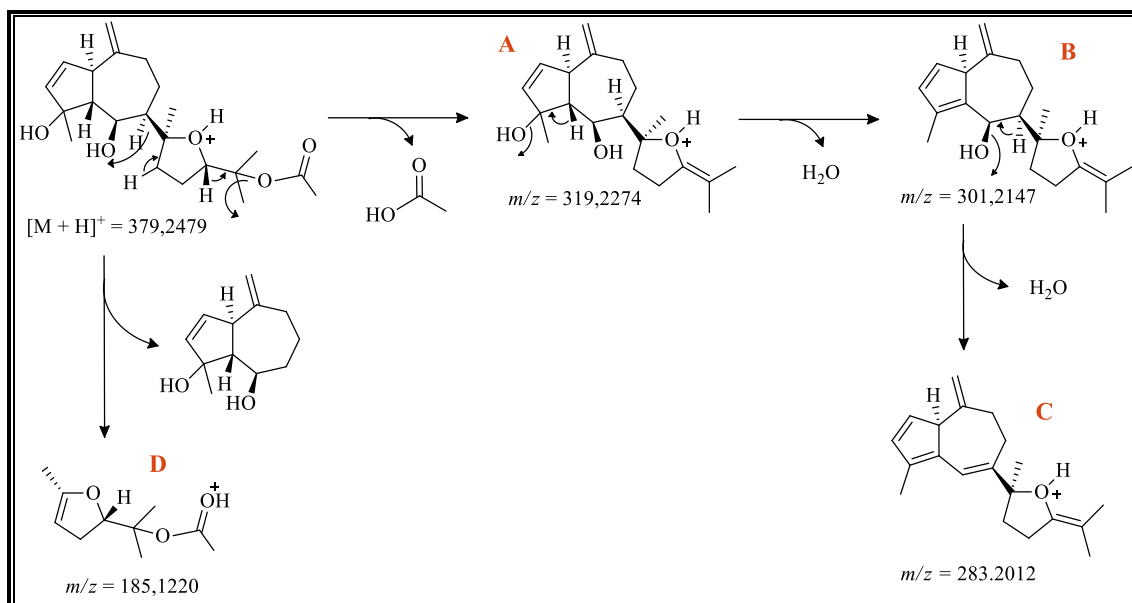
O espectro de massas obtido por *eletrospray* (ESI+), do composto DM-03 (Figura 27) não apresentou o pico referente ao íon molecular, contudo mostrou fragmentos correspondentes a perda de uma unidade de CH_3COOH [$\text{M}+\text{H}^+-60$] resultando no íon de $m/z = 319,2274$ u.m.a referente ao fragmento A, seguido pela perda de duas unidades de água ($m/z = 301,2147$ u.m.a e $m/z = 283,2012$ u.m.a), fragmentos B e C, respectivamente, além de um pico referente a unidade prenila ($m/z = 185,1220$ u.m.a), fragmento D (Figura 28), confirmando a estrutura do composto. Com base em levantamento bibliográfico o composto DM-03 se trata de um novo diterpeno.

Figura 27 – Espectro de massas do composto DM-03



Própria autora

Figura 28 – Proposta mecanística de fragmentação para DM-03

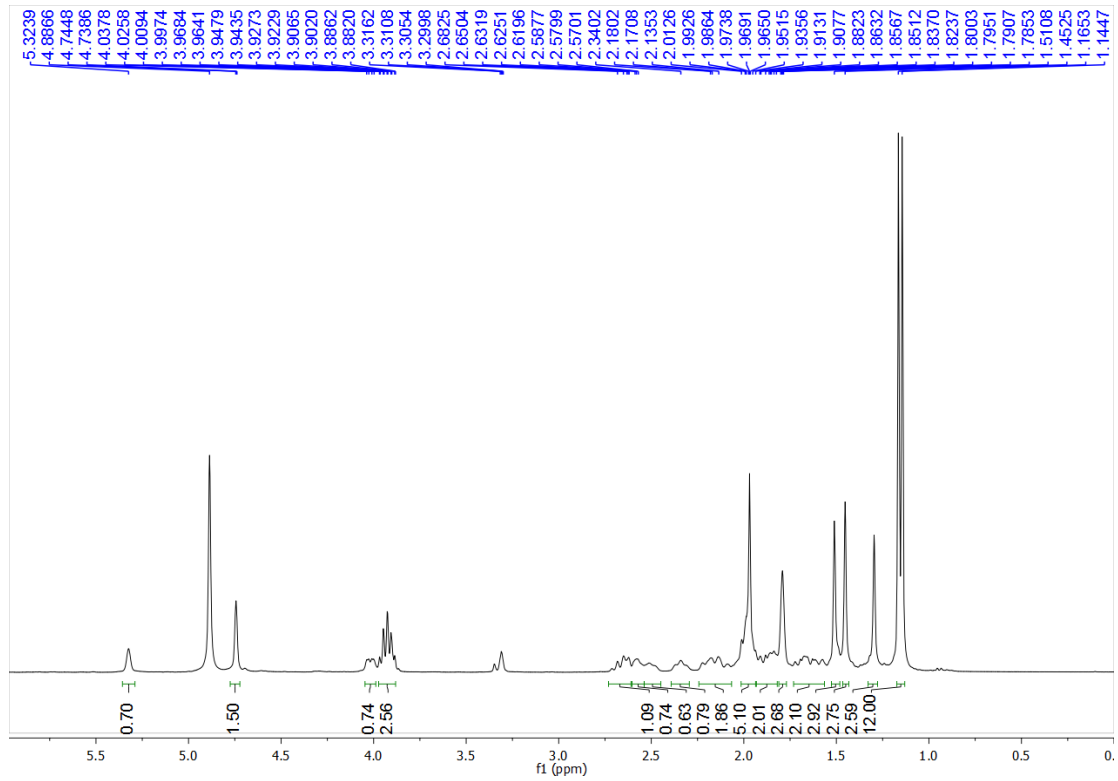


Fonte: Própria autora.

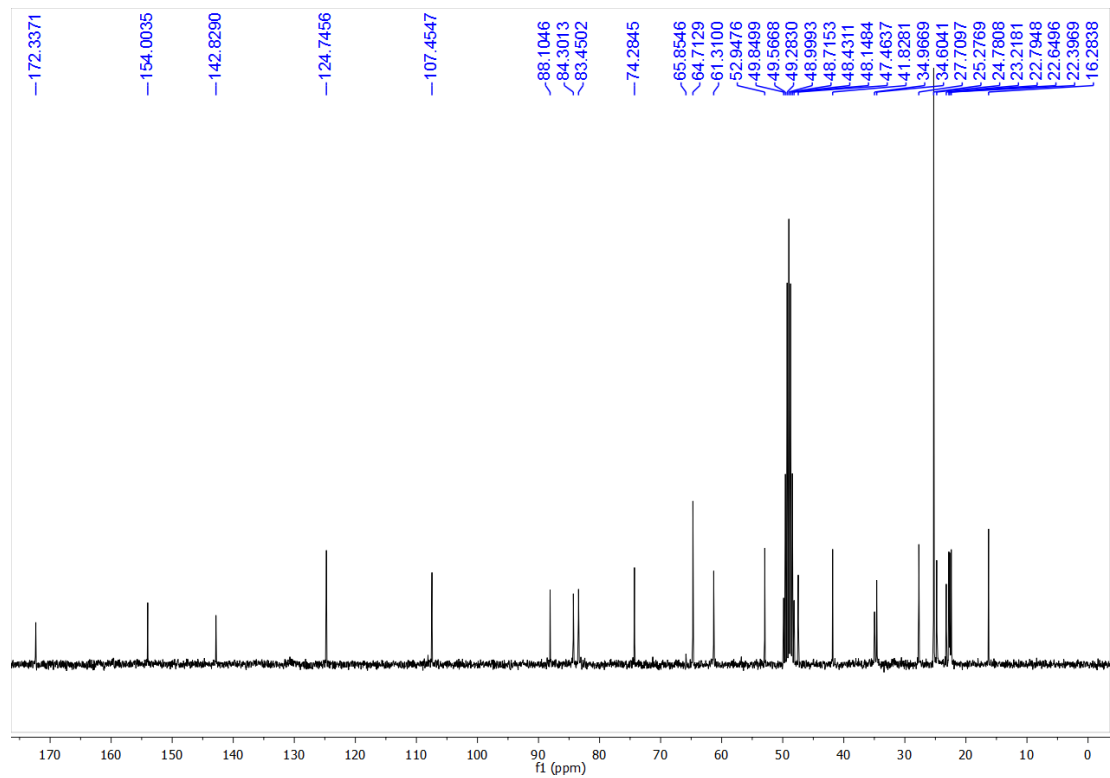
5.1.4. Determinação estrutural de DM-04

O composto DM-04 (uma resina amarelada apresentando UV(MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ 199 nm) foi isolado a partir do extrato acetato de etila utilizando CLAE. Sua estrutura foi determinada através de comparação de seus dados espectroscópicos e espectrométricos com os dados do composto DM-03. Nos apêndices encontram-se os espectros de HMQC (Apêndice 4A) e HMBC (Apêndice 4B) do composto DM-04.

A partir das semelhanças observadas entre os dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto DM-04 e DM-03, conforme apresentados na Tabela 5, ficou claro que os mesmos apresentam estruturas semelhantes, mas com uma dupla ligação endocíclica trissubstituída em vez de dissubstituída, em virtude do aparecimento de um único sinal de hidrogênio em δ_{H} 5,30 (s, H-3)/ δ_{C} 124,9 (C-3), corroborando com o desaparecimento do sinal de carbono oxigenado presente em DM-03 (Figura 29 e 30).

Figura 29 – Espectro de RMN ^1H de DM-04

Fonte: Própria autora.

Figura 30 – Espectro de RMN ^{13}C de DM-04

Fonte: Própria autora.

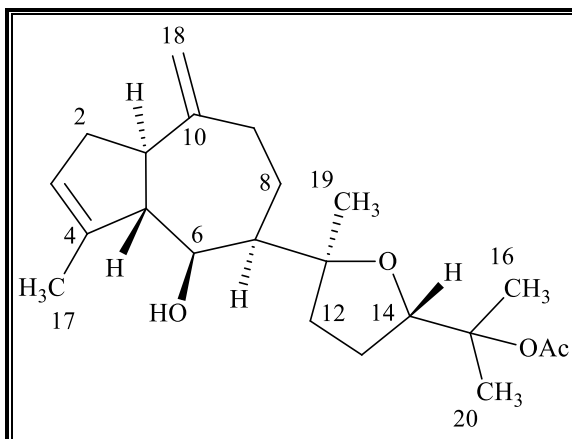
Tabela 5 – Comparação dos deslocamentos químicos observados para DM-03 e DM-04

DM-03	δ_C	δ_H	DM-04	δ_C	δ_H
C			C		
4	97,0	-	4	142,8	-
10	152,3	-	10	154,0	-
11	87,1	-	11	88,1	-
15	82,3	-	15	84,3	-
15'-OAc	170,5	-	15'-OAc	172,3	-
CH			CH		
1	50,0	2,97 (d, $J = 9,0$)	1	47,4	-
2	133,9	5,84 (dd, $J = 5,8; 1,8$)	-	-	-
3	134,9	5,82 (dd, $J = 5,8; 1,8$)	3	124,7	5,32 (s)
5	60,3	2,25 (t, $J = 9,1$)	5	61,3	-
6	68,9	4,40 (dd, $J = 9,0; 3,2$)	6	74,2	-
7	51,7	1,78 (m)	7	52,9	-
14	83,6	3,84 (t, $J = 7,3$)	14	83,4	-
CH₂			CH₂		
-	-	-	2	34,8	2,57 (m)
8	23,0	1,77 (m)	8	23,2	-
9	40,2	2,07 (m); 2,61 (m)	9	41,8	-
12	35,5	1,72 (m); 2,05 (m)	12	34,9	1,79 (s)
13	26,1	1,98 (m)	13	27,7	1,88 (m)
18	108,7	4,64 (s); 4,71 (s)	18	107,4	4,74 (s)
CH₃			CH₃		
15'-COOMe	22,4	1,95 (s)	15'-COOMe	22,7	1,51 (s)
16	22,6	1,51 (s)	16	25,2	1,51 (s)
17	22,7	1,45 (s)	17	16,2	1,78 (s)
19	24,6	1,31 (s)	19	22,6	1,51 (s)
20	19,0	1,40 (s)	20	22,3	1,51 (s)

Fonte: Própria autora.

A comparação dos dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto DM-04 com os dados do diterpeno dictyol H (ALARADO; GERWICK, 1985), foi possível confirmar a identidade deste (Figura 31). Dictyol H foi previamente isolado da alga parda *Dictyota dentata*.

Figura 31 – Estrutura do composto DM-04

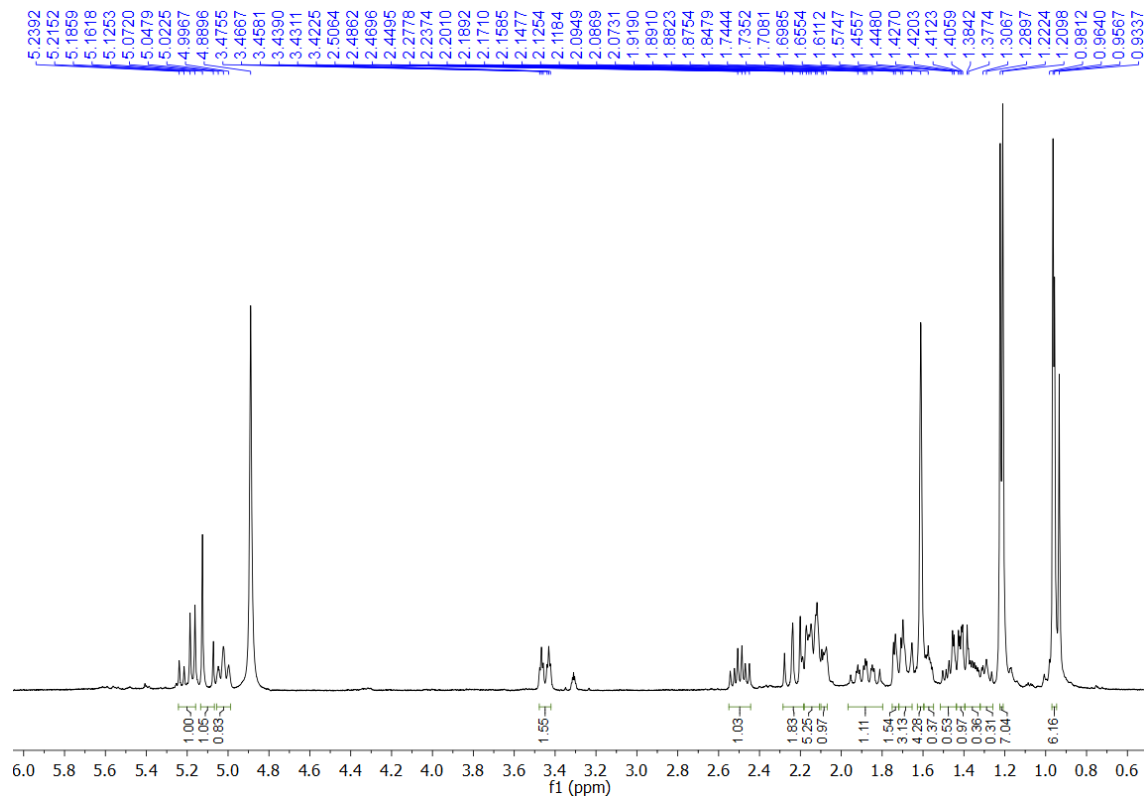


Fonte: Própria autora.

5.1.5. Determinação estrutural de DM-05

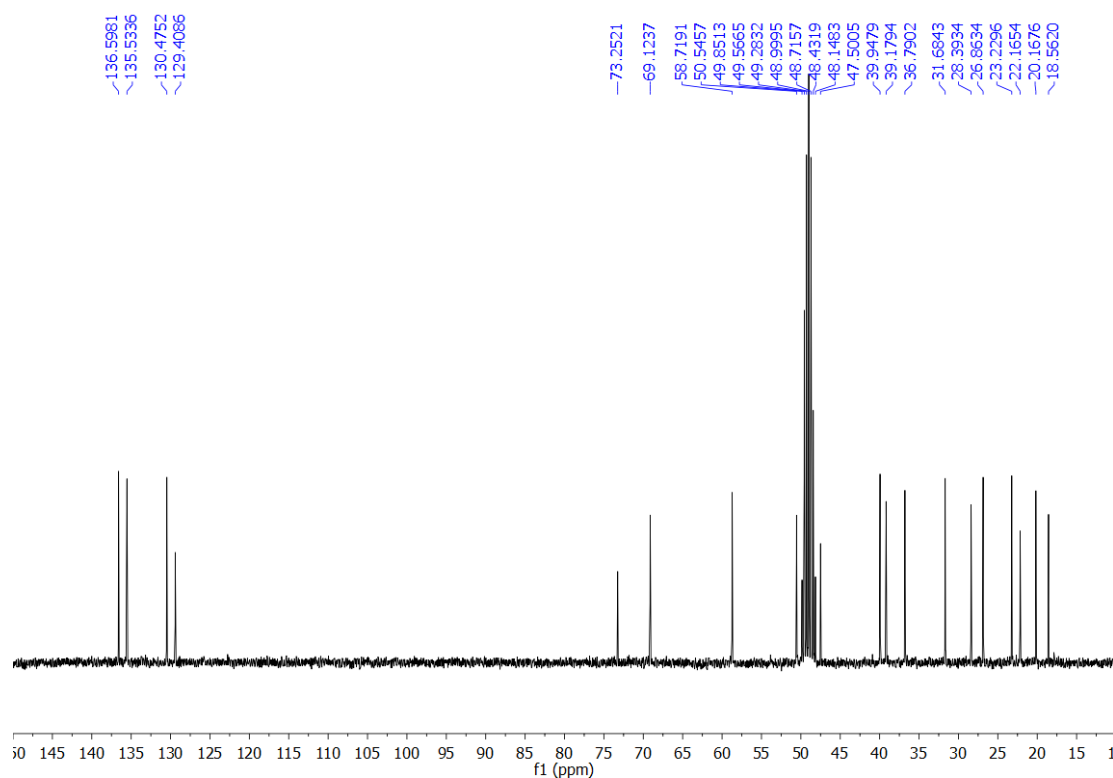
O composto DM-05, uma resina de cor levemente verde (apresentando UV(MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ 193 nm) foi isolado a partir do extrato acetato de etila

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 32) mostrou sinais para três hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,24 (d), 5,12 (d) e 5,02 (t); um sinal para hidrogênio ligado a carbono oxigenado em δ_{H} 3,47 (dt) e sinais para hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos (Tabela 6). Os deslocamentos químicos observados no espectro de RMN ^1H do composto DM-05 indicam um diterpeno. Este quando comparado com os dos compostos DM-03 e DM-04, apresentados anteriormente, não foram compatíveis com um esqueleto guaiano.

Figura 32 – Espectro de RMN ^1H de DM-05

Fonte: Própria autora.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 33) mostrou 20 linhas espectrais, corroborando com a proposta desse composto ser um diterpeno. Dentre os sinais observados destacaram-se os sinais em δ_{C} 136,8, 135,9, 130,9 e 129,5 para carbonos olefínicos e os sinais em δ_{C} 73,4 e 69,5 para carbonos oximetínicos. A análise dos espectros de RMN APT (Apêndice 5A) e HMQC (Apêndice 5B) ressaltaram o padrão de hidrogenação: cinco carbonos metílicos, cinco metilênicos, sete metínicos e três carbonos não-hidrogenados, como pode ser visto na Tabela 6.

Figura 33 – Espectro de RMN ^{13}C de DM-05

Própria autora.

Tabela 6 – Deslocamentos químicos observados para o composto DM-05 e suas principais correlações no HMQC e HMBC – Continua

DM-05				
C	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3\text{-}^4J_{\text{CH}}$
1	47,5	-	H-2; H-11; H-15	H-3
8	129,4	-	-	-
18	73,2	-	H-12; H-19; H-20	H-11
CH				
2	136,5	5,12 (d, $J = 16,0$)	H-3	H-15; H-16
3	135,5	5,23 (d, $J = 16,0$)	H-2	H-16
4	39,1	2,09 (m)	H-3	-
7	130,4	5,02 (t, $J = 7,47$)	-	-
10	69,1	3,47 (dt, 10,7; 2,5)	H-9; H-11	H-12
11	58,7	1,74 (dd, $J = 10,9; 2,9$)	H-12	H-9; H-15
12	49,8	2,50 (td, $J = 11,0; 6,0$)	-	H-19; H-20
CH₂				
5	36,7	1,57 (m); 1,42 (m)	-	H-16
6	28,3	2,15 (m)	H-7	-
9	50,5	2,27 (dd, $J = 12,2; 12,1$); 2,12 (m)	-	H-7; H-17
13	26,8	1,88 (m); 1,30 (m)	H-12	-

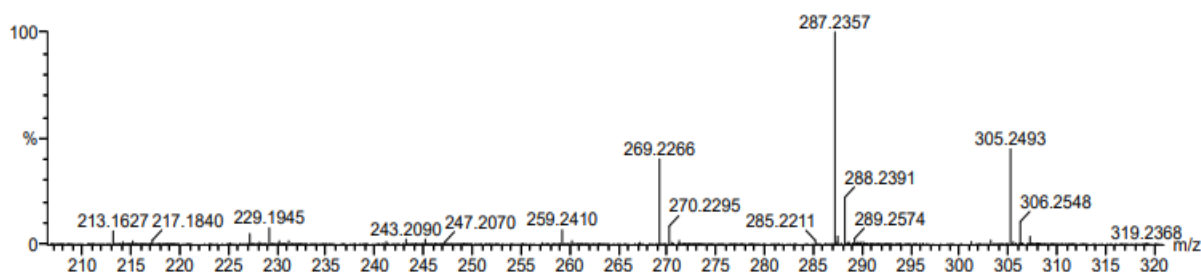
Tabela 7 – Deslocamentos químicos observados para o composto DM-05 e suas principais correlações no HMBC – Continuação

14	39,9		-	H-12; H-15
CH₃				
15	20,1	0,96 (s)	H-1	H-2
16	22,1	0,95 (d, $J = 6,9$)	-	H-3
17	18,5	1,61 (s)	-	H-7; H-9
19	23,2	1,20 (s)	-	H-12; H-20
20	31,6	1,22 (s)	-	H-12; H-19

Fonte: Própria autora.

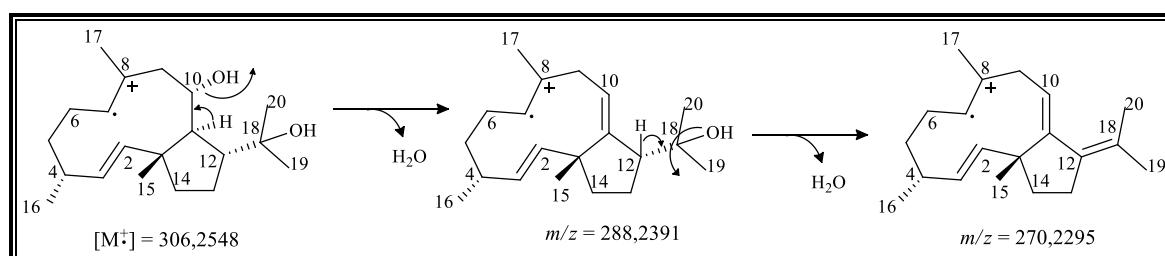
A análise conjunta dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C permitiu a dedução da fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{O}_2$, com índice de deficiência de hidrogênio (IDH) = 4, a qual foi confirmada pelo espectro de massas de alta resolução (ESI+) (Figura 34) através do cátion radicalar $[\text{M}\cdot^+]$ m/z 306,2548 u.m.a, seguido pela 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 35.

Figura 34 – Espectro de massas do composto DM-05



Fonte: Própria autora.

Figura 35 – Proposta mecanística de fragmentação para DM-05

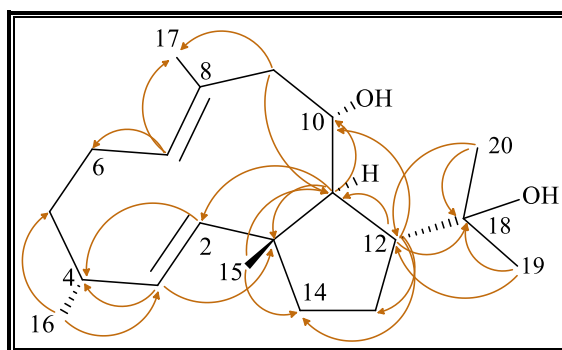


Fonte: Própria autora.

Por fim as correlações observadas no espectro de RMN HMBC (Apêndice 5C) (Tabela 6) confirmaram a proposta estrutural da molécula (Figura 36).

Pesquisas realizadas na literatura mostraram que o composto em questão trata-se de um diterpeno de esqueleto dolabelano previamente isolado da glândula digestiva de *Dollabella californica*, um molusco conhecido como lebre do mar. Vale salientar que este tipo de diterpeno é comum em algas e não em moluscos. Assim, muito provavelmente, este composto é fruto do metabolismo das algas e encontra-se no molusco, acima citado, devido a sua alimentação (IRELAND *et al.*, 1976). Comprovando a teoria levantada, esse composto foi posteriormente isolado da alga parda, *Dictyota dichotoma* (AMICO *et al.*, 1980).

Figura 36 – Estrutura e principais correlações observadas no espectro 2D HMBC para DM-05



Fonte: Própria autora.

5.2. Ensaaios farmacológicos

Os testes de viabilidade celular e inibição da produção de ON foram realizados para os compostos DM-01 a DM-04.

5.2.1. Ensaaios de viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio colorimétrico de MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl

tetrazolium bromide) e se baseia no fato do MTT ser reduzido pelo sistema enzimático succinatotetrazol redutase, proveniente da respiração mitocondrial, a um sal, formazan, que possui com púrpura. Dessa forma a redução do MTT indica um aumento da atividade metabólica celular (MOSMANN, 1983).

Na Figura 37 e 38 e Tabela 7 podem ser observados os perfis dos compostos sobre a viabilidade celular que se mostram semelhantes entre os compostos que são estruturalmente similares, DM-01 e 02 e DM-03 e 04. Os compostos DM-01 e 02 apresentam citotoxicidade a partir da concentração de 12 μM , enquanto que os compostos DM-03 e 04 a citotoxicidade é observada a partir da concentração de 100 μM .

Tabela 8 – Viabilidade celular em células RAW 264.7

Compostos DM-	CI ₅₀ ^a \pm SD (μM)
01	24,8 \pm 2,2
02	26,9 \pm 2,0
04	106,2 \pm 2,1
05	97,1 \pm 2,8

Fonte: Laboratório de Produtos Naturais

Valores de ^aCI₅₀ foram definidos pelas concentrações que resultaram em redução de 50% da viabilidade celular. Os valores representam a média dos resultados de três experimentos independentes.

Figura 37 – Perfil de viabilidade celular em células RAW 264.7 para DM- 01 e 02

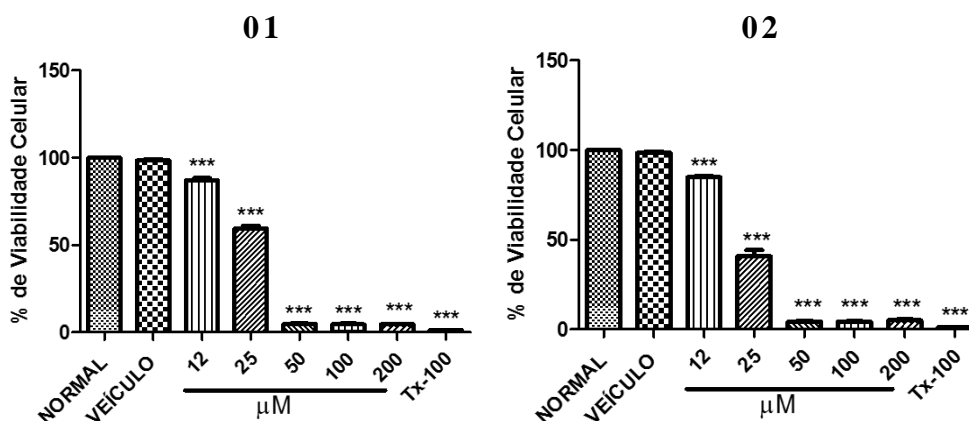
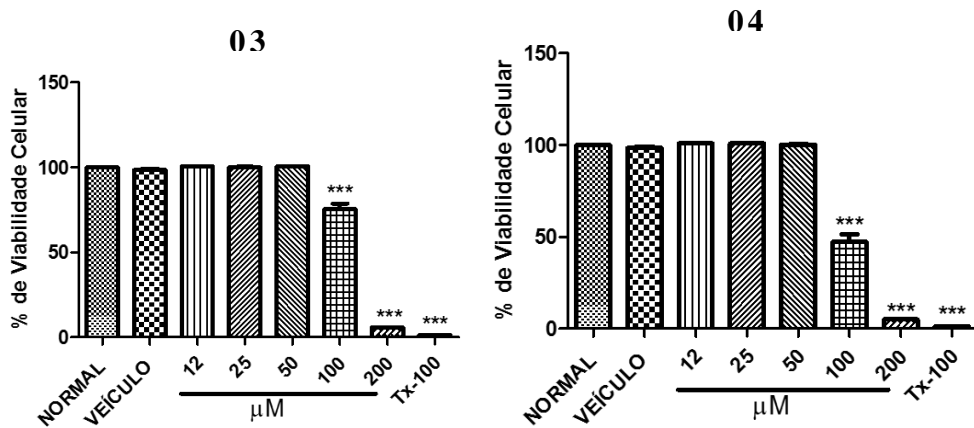


Figura 38 – Perfil de viabilidade celular em células RAW 264.7 para DM- 03 e 04



Fonte: Laboratório de Produtos Naturais

Efeito dos compostos 01, 02, 03 e 04 sobre a viabilidade celular determinada. Normal (células não tratadas); Veículo (DMSO 1%); Tx-100 (Triton X-100; 0,2% v/v; padrão citotóxico). Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média. *** P < 0,001 vs grupo Normal (ANOVA e Teste de Tukey).

5.2.2. Teste de inibição da produção de ON

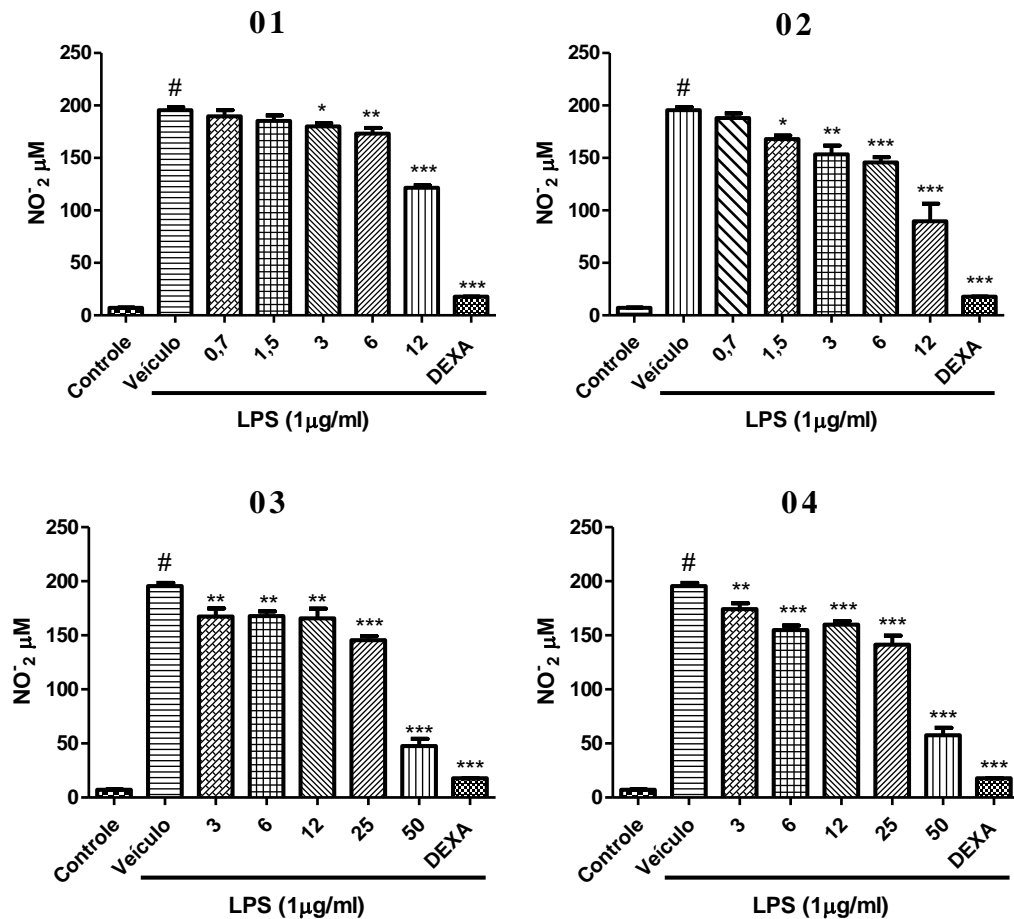
O processo inflamatório resulta na produção de espécies reativas de oxigênio e radicais livres, como o óxido nítrico (ON), que em quantidade exacerbadas levam à danos celulares. Devido a meia-vida curta, a produção de ON é determinada pela quantificação de seus metabólitos nitrato/nitrito, utilizando o reagente de Griess-Saltzman (SALTZMAN, 1965). O nitrato é convertido em nitrito pelo meio reacional, permitindo a quantificação de nitrito total.

Com base nos resultados encontrados, foi possível determinar o perfil citotóxico dos compostos, bem como, estabelecer as concentrações viáveis para a quantificação de ON, como observado na Figura 39.

O composto DM-01 promoveu redução significativa de ON a partir da concentração de 3 μM (180,1 ± 6,1 μM), 6 μM (173,2 ± 11,5 μM) e 12 μM (121,5 ± 4,7 μM). O composto DM-02 apresentou capacidade redutora nas concentrações de 1,5 μM (168,1 ± 6,3 μM), 3

μM ($153,3 \pm 16,6 \mu\text{M}$), $6 \mu\text{M}$ ($145,8 \pm 10,0 \mu\text{M}$) e $12 \mu\text{M}$ ($89,7 \pm 3,3 \mu\text{M}$) quando comparado com o grupo veículo (DMSO 0,1 %) ($195,4 \pm 6,0 \mu\text{M}$). Os compostos DM- 03 e 04 também apresentaram perfil semelhante na redução do ON em todas as concentrações testadas. O melhor efeito redutor foi observado nas concentrações de $50 \mu\text{M}$ destes compostos que reduziram, respectivamente, em 75,6% e 70,5% a liberação de ON. Dexametasona promoveu redução de 91,18% quando comparado com o grupo veículo.

Figura 39 – Atividade inibitória na produção de ON em células RAW 264.7 estimuladas com LPS



Fonte: Laboratório de Produtos Naturais

Capacidade de 01,02, 03 e 04 em inibir a geração de óxido nítrico em células RAW 264.7 estimuladas com LPS.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ e * $p < 0.05$ vs grupo veículo (Teste Tukey).

6. CONCLUSÃO

O estudo químico de *D. mertensii* resultou no isolamento de dois sais quaternários de amônio e três diterpenos. O isolamento de diterpenos corrobora com estudos químicos prévios, entretanto, o isolamento dos sais de amônio é inédito a partir de algas. 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 as algas podem estar bioadsorvendo, visto que são seres filtrantes, estes compostos como consequência de um ambiente poluído.

Nos testes de viabilidade celular os compostos DM-01 e DM-02 apresentam citotoxicidade a partir da concentração de 12 μM , enquanto que os compostos DM-03 E DM-04 a citotoxicidade é observada a partir da concentração de 100 μM .

Nos testes de inibição de óxido nítrico, o melhor efeito redutor foi observado nas concentrações de 50 μM dos compostos DM-03 e 04 que reduziram, respectivamente, em 75,6% e 70,5% a liberação de ON, sendo assim, se apresentam como um potencial anti-inflamatório.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA-MORALES, M. *et al.* Chemical composition and microbiological assays of marine algae *Enteromorpha* spp. As a potential food source. **Journal of Food Composition and analysis**, v. 18, p. 79-88, 2005.
- ALARADO, A. B.; GERWICK, W. H. Dictyol H, a New Tricyclic Diterpenoid from the Brown Seaweed *Dictyota dentata*. **Journal Of Natural Products**, v. 48, n. 1, p.132-134, 1985.
<http://dx.doi.org/10.1021/np50037a026>.
- ALVAREZ, N. O.; PEÑA, E. J. Alternativas de Monitoreo de Calidad de Aguas: Algas como Bioindicadores. **Acta Nova**, Santiago, v. 2, n. 4, p.513-517, dez. 2004.
- AMICO, V. *et al.* Diterpenes based on the dolabellane skeleton from *dictyota dichotoma*. **Tetrahedron**, v. 36, n. 10, p.1409-1414, 1980.
[http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020\(80\)85055-1](http://dx.doi.org/10.1016/0040-4020(80)85055-1).
- ARESTA, M. *et al.* Production of biodiesel from macroalgae by supercritical CO₂ extraction and thermochemical liquefaction. **Environmental Chemistry Letters**, v. 3, p. 136-139, 2005.
- BARBIERI, E. (2004). Oceanos: reguladores do clima do planeta. **Ciência Hoje**. 35. 71-73. Disponível em:
https://www.researchgate.net/publication/282644031_Oceanos_reguladores_do_clima_do_planeta>. Acesso em: 28 set. 2018.
- BLACKMAN, A. J.; ROGERS, G. I.; VOLKMAN, J. K. Phloroglucinol Derivatives from Three Australian Marine Algae of the Genus *Zonaria*. **Journal Of Natural Products**, v. 51, n. 1, p.158-160, 1988.
<http://dx.doi.org/10.1021/np50055a027>.
- BLUNT, J. W. *et al.* Marine natural products. **Natural Product Reports**, [s.l.], v. 26, n. 2, p.170-244, 2009.
<http://dx.doi.org/10.1039/b805113p>.
- Central Intelligence Agency (CIA). **The World Factbook**. Disponível em: <https://www.cia.gov/library/publications/the-world-factbook/fields/2060.html>>. Acesso em: 15 maio 2018.
- CHENG, S. *et al.* Diterpenes from a Chinese Collection of the Brown Alga *Dictyota plectens*. **Journal Of Natural Products**, v. 77, n. 12, p.2685-2693, 15 dez. 2014. <http://dx.doi.org/10.1021/np5006955>.
- CLASSIFICAÇÃO dos organismos marinhos. 2010. Disponível em: <https://nilson01.wordpress.com/2010/06/01/biologia-marinha-2/#top>>. Acesso em: 01 jun. 2018.

DAWCZYNSKI, C.; SCHUBERT, R.; JAHREIS, G. Amino acids, fatty acids and dietary fibre in edible seaweeds products. **Food Chemistry**, v. 103, p. 891-899, 2007.

DE PAULA, J. C.; VALLIM, M. A.; TEIXEIRA, V. L. What are and where are the bioactive terpenoids metabolites from Dictyotaceae (Phaeophyceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p.216-228, 2011. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2011005000079>.

FERREIRA, J. *et al.* Drug resistance in glioblastoma and cytotoxicity of seaweed compounds, alone and in combination with anticancer drugs: A mini review. **Phytomedicine**, v. 48, p.84-93, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2018.04.062>.

GAMAL, A. A. E. Biological importance of marine algae. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 18, n. 1, p.1-25, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2009.12.001>.

GREENPEACE (Brasil). **Nossos oceanos e o clima**. 2009. Disponível em: <<https://www.greenpeace.org/brasil/blog/nossos-oceanos-e-o-clima/>>. Acesso em: 28 set. 2018.

HADJU, E.; PEIXINHO, S.; FERNANDEZ, J. C.c.. **Esponjas marinhas da Bahia**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2011. 276 p.

INATURALIST. **Macrocystis pyrifera**. Disponível em: <<https://www.inaturalist.org/taxa/124748-Macrocystis-pyrifera>>. Acesso em: 30 set. 2018.

IRELAND, C. *et al.* A novel diterpene from *Dollabella californica*. **Journal Of The American Chemical Society**, [s.l.], v. 98, n. 15, p.4664-4665, jul. 1976. <http://dx.doi.org/10.1021/ja00431a063>.

LEE, R. E. **Phycology**. 4. ed. New York: Cambridge University Press, 2008.

LIMA, M. A. C. S. **A importância das algas**. Disponível em: <<http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/biologia/a-importancia-das-algas.htm>>. Acesso em: 15 maio 2018.

LORENZO, V. P. **Estudo fitoquímico com fins farmacológicos da alga bentônica *Caulerpa racemosa***. 2010. 129 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmacoquímica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

MAITI, B. C.; THOMSON, R. H. Caulerpin. In: Faulkner D.J., Fenical W.H. (eds). **Marine Natural Products Chemistry**, Boston, MA, Nato Conference Series, v. 1, p.159-163. 1977. Springer US.

Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Brasileira**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>>. Acesso em: 15 maio 2018.

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

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURA, L. A. *et al.* Antiplatelet and Anticoagulant Effects of Diterpenes Isolated from the Marine Alga, *Dictyota menstrualis*. **Marine Drugs**, v. 12, n. 5, p.2471-2484, 2014. <http://dx.doi.org/10.3390/md12052471>.

OTHMANI, A. *et al.* Anti-microfouling properties of compounds isolated from several Mediterranean *Dictyota* spp. **Journal Of Applied Phycology**, p.1573-1584, 2013. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-013-0185-2>.

PEREIRA, R. *et al.* Marine Diterpenes: Molecular Modeling of Thrombin Inhibitors with Potential Biotechnological Application as an Antithrombotic. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 15, n. 3, p.79, 2017. <http://dx.doi.org/10.3390/md15030079>.

PILLON, R. **Ulva rigida**. 2012. Disponível em: <<http://www.marinespecies.org/photogallery.php?album=770&pic=49994>>. Acesso em: 30 set. 2018.

POCKLINGTON, J. **Red Seaweed: Corallina officinalis**. 2011. Taxonomic Toolkit for marine life of Port Phillip Bay, Museum Victoria. Disponível em: <<http://portphillipmarinelife.net.au/species/11186>>. Acesso em: 30 set. 2018.

QUATERNÁRIO de amônio. Disponível em: <<http://www.chemax.com.br/quaternario-amonio>>. Acesso em: 15 dez. 2018.

REVIERS, B.; ROUSSEAU, F.; DRAISMA, S. G.a. Classification of the Phaeophyceae from past to present and current challenges. In: BRODIE, J; LEWIS, J(Ed.). **Unravelling the algae: the past, present and future of algal molecular systematics**. Systematics Association, p. 267-284. 2007.

REYNOL, F. **Algas marinhas multiuso**. 2010. Disponível em: <http://agencia.fapesp.br/algas_marinhas_multiuso/12748/>. Acesso em: 15 maio 2018.

RUIZ-TORRES, V.; ENCIMAR, J. A.; MICOL, V. An Updated Review on Marine Anticancer Compounds: The Use of Virtual Screening for the Discovery of Small-Molecule Cancer Drugs. **Molecules** . v. 22, p. 1000-1037, 2017.

SAHOO, D.; SECKBACH, J. **The Algae World**: Springer, 2015. 26 v. (Cellular Origin, Life in Extreme Habitats and Astrobiology).

SALTZMAN, B. E.; WARTBURG, A. F. Precision Flow Dilution System for Standard Low Concentrations of Nitrogen Dioxide. **Analytical Chemistry**, v. 37, n. 10, p. 1261-1264, 1965.

SILBERFELD, T. *et al.* A multi-locus time-calibrated phylogeny of the brown algae (Heterokonta, Ochrophyta, Phaeophyceae): Investigating the evolutionary nature of the “brown algal crown radiation”. **Molecular Phylogenetics And Evolution**, v. 56, n. 2, p.659-674, 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ympev.2010.04.020>.

SILVERSTEIN, R.M., BASSLER, G.C., MORRIL, T.C., **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 5. ed, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1994.

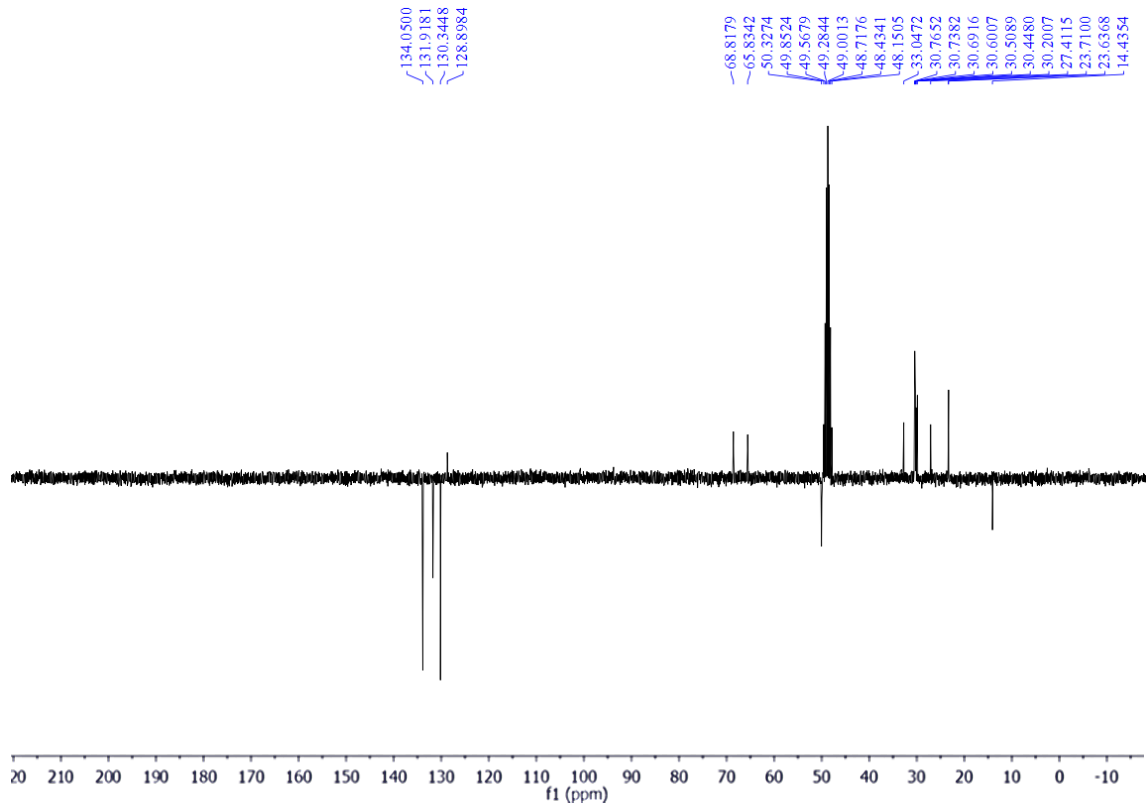
SOUZA, É. T. *et al.* The Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of Caulerpin, a Bisindole Alkaloid Isolated from Seaweeds of the Genus Caulerpa. **Marine Drugs**, v. 7, n. 4, p.689-704, 2009. <http://dx.doi.org/10.3390/md7040689>. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-3397/7/4/689/htm>>. Acesso em: 27 ago. 2018.

TEIXEIRA, V. L. Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas. **Rev Virtual Quim**. 2013, v. 5, n.3.

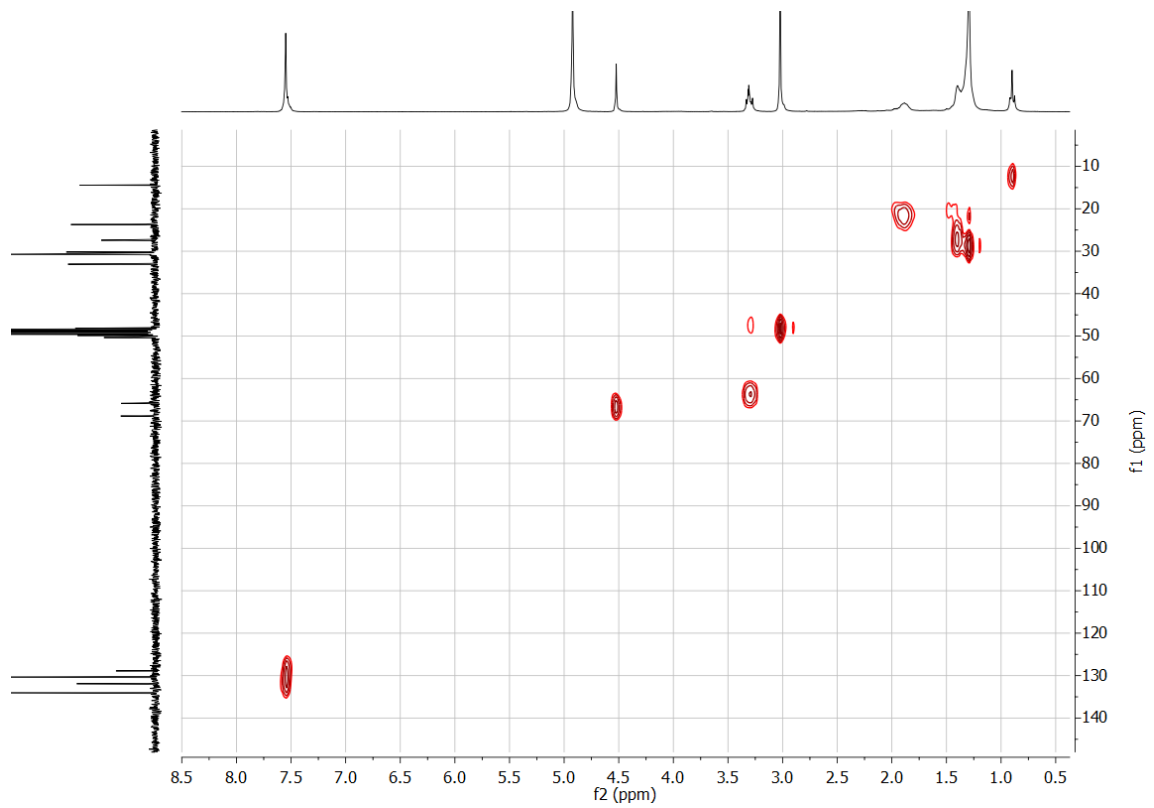
VALLIM, Magui Aparecida *et al.* The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical Atlantic American region. **Biochemical Systematics And Ecology**, v. 33, n. 1, p.1-16, 2005. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2004.06.002>.

VIDAL, R. M. B. **Caracterização hidrológica e geoquímica das áreas adjacentes aos bancos oceânicos do Nordeste brasileiro**. 2004. 196 f. Tese (Doutorado) - Curso de Geociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

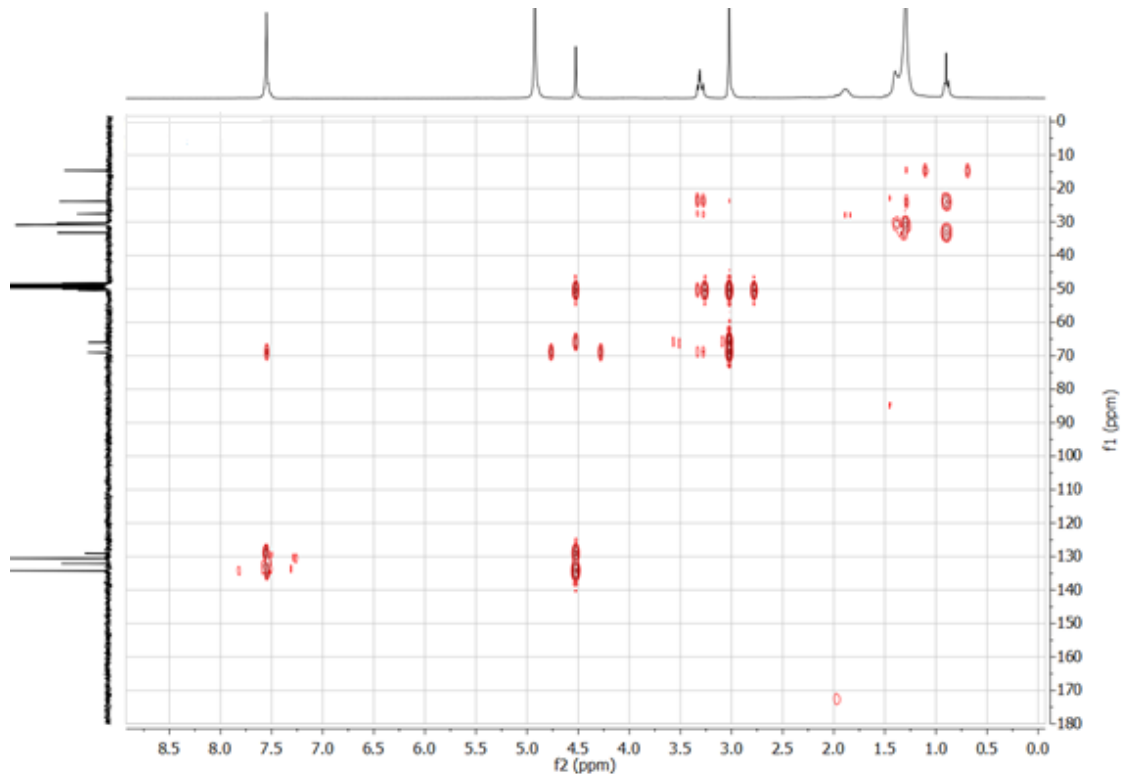
APÊNDICE 1A – Espectro RMN ^{13}C -APT do composto DM-01



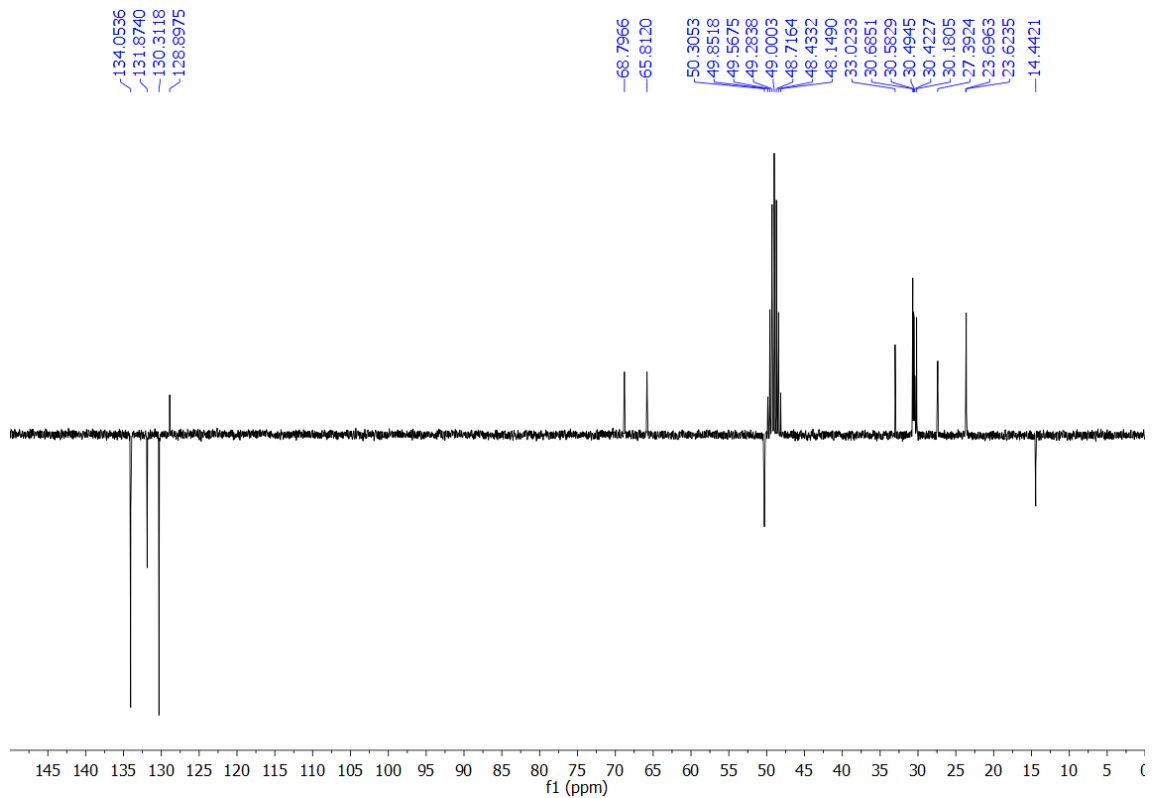
APÊNDICE 1B – Espectro HMQC do composto DM-01

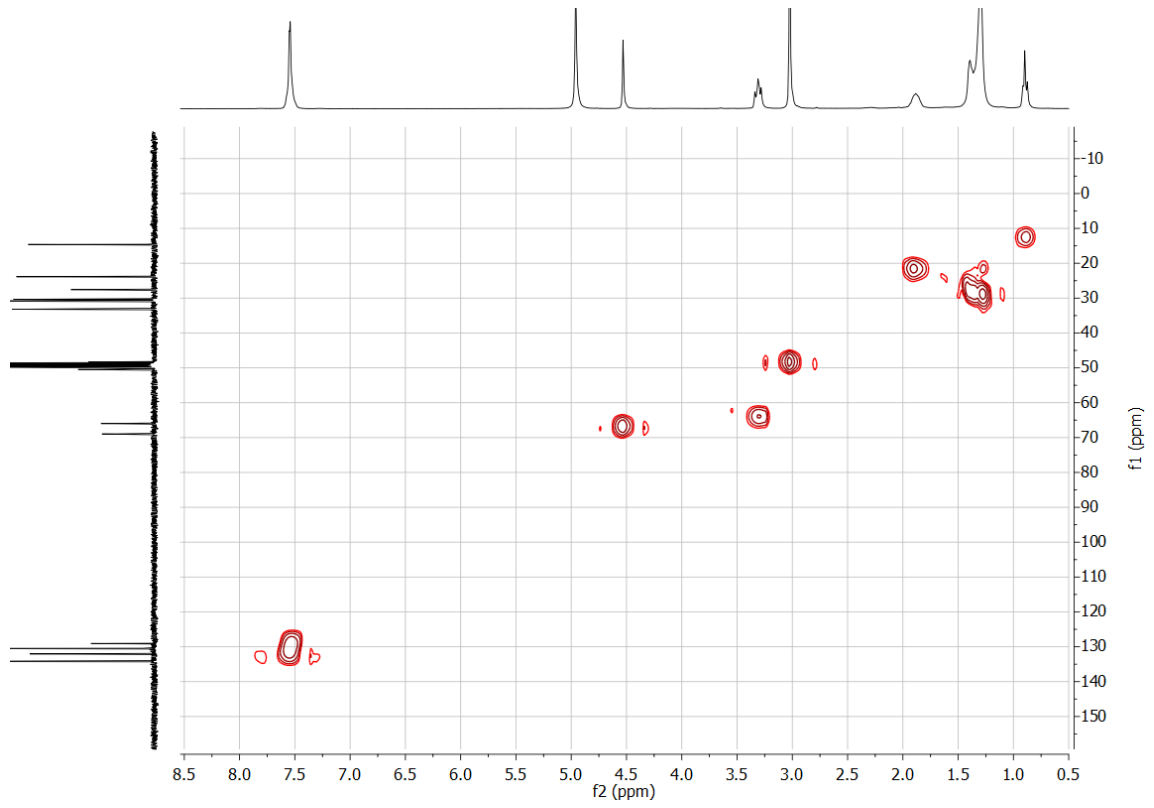
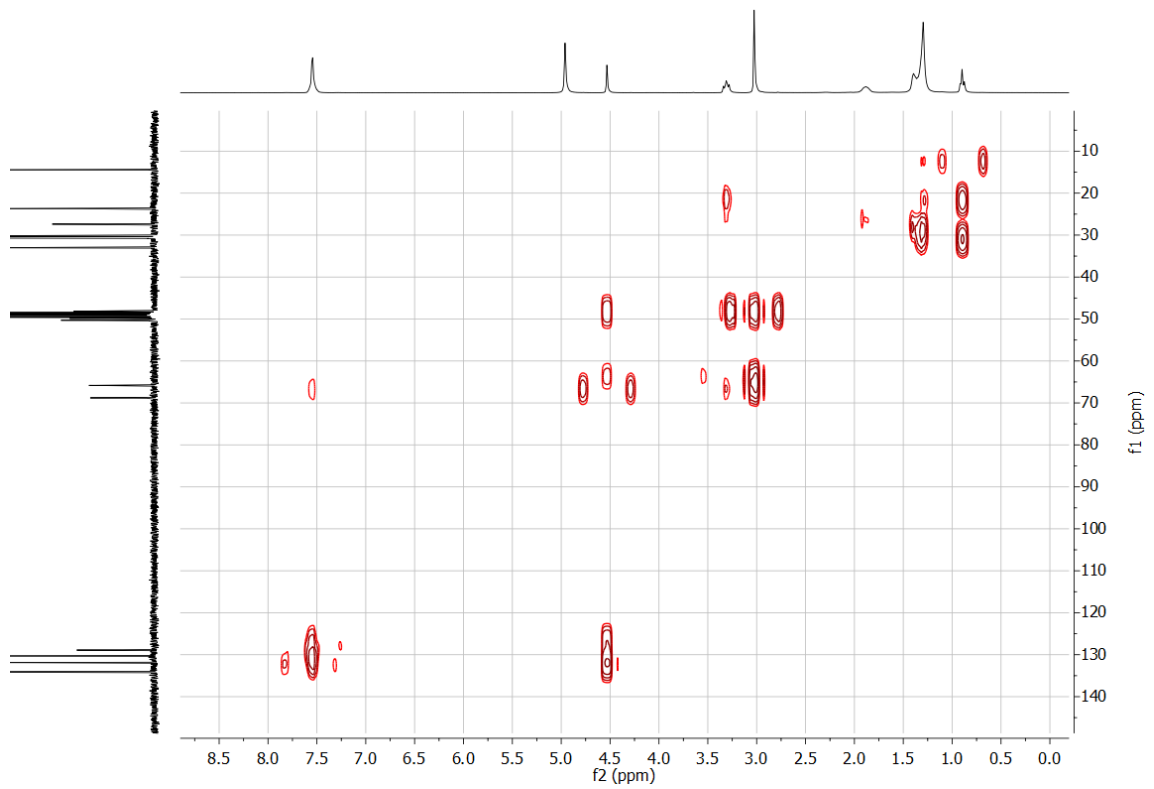


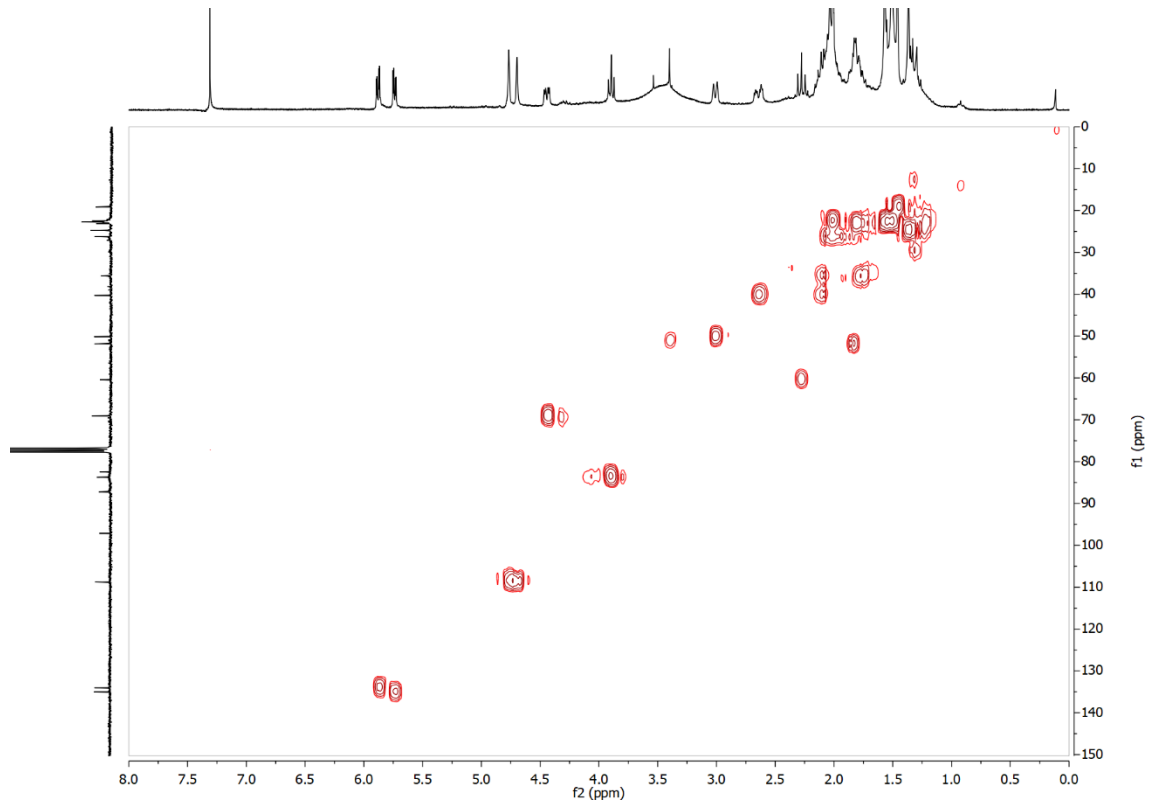
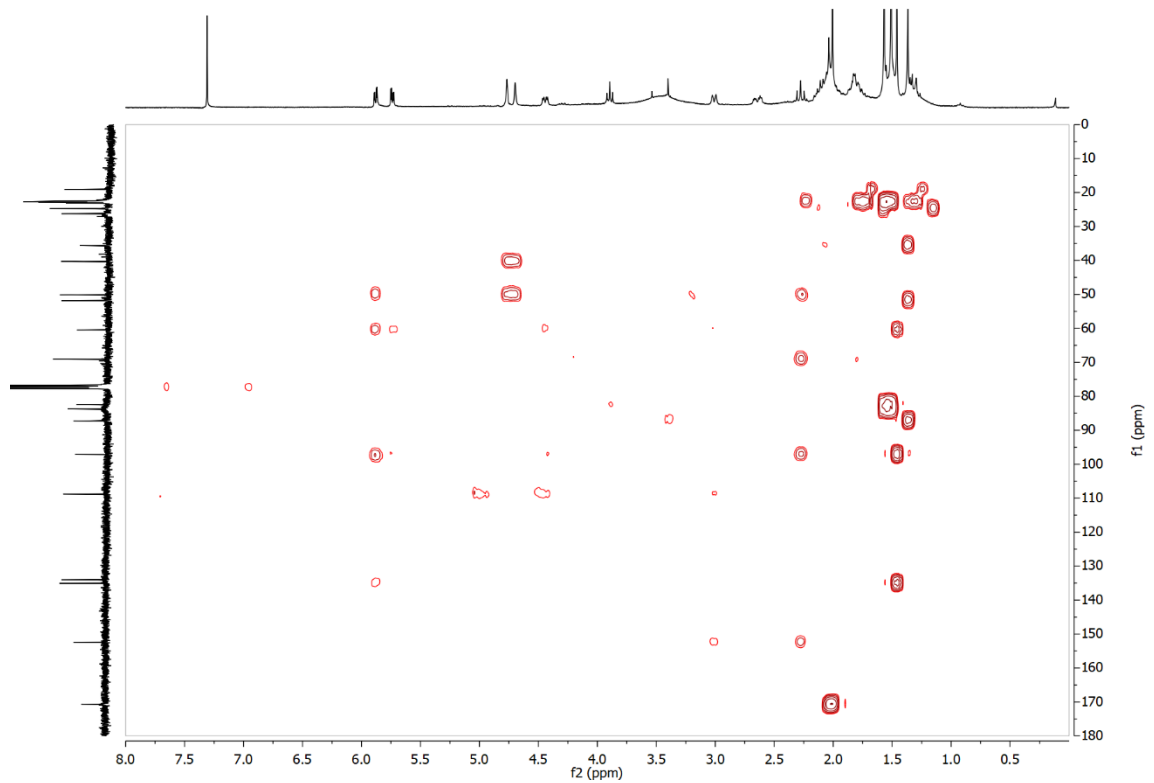
APÊNDICE 1C – Espectro HMBC do composto DM-01

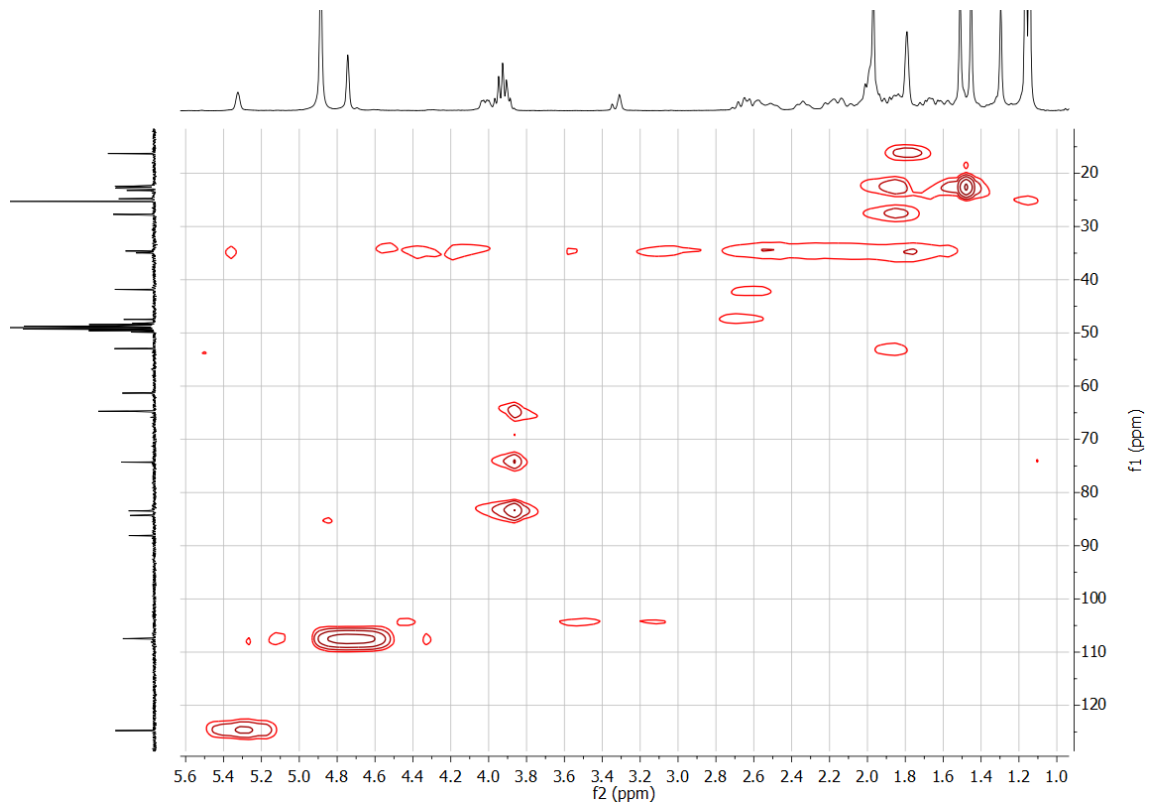
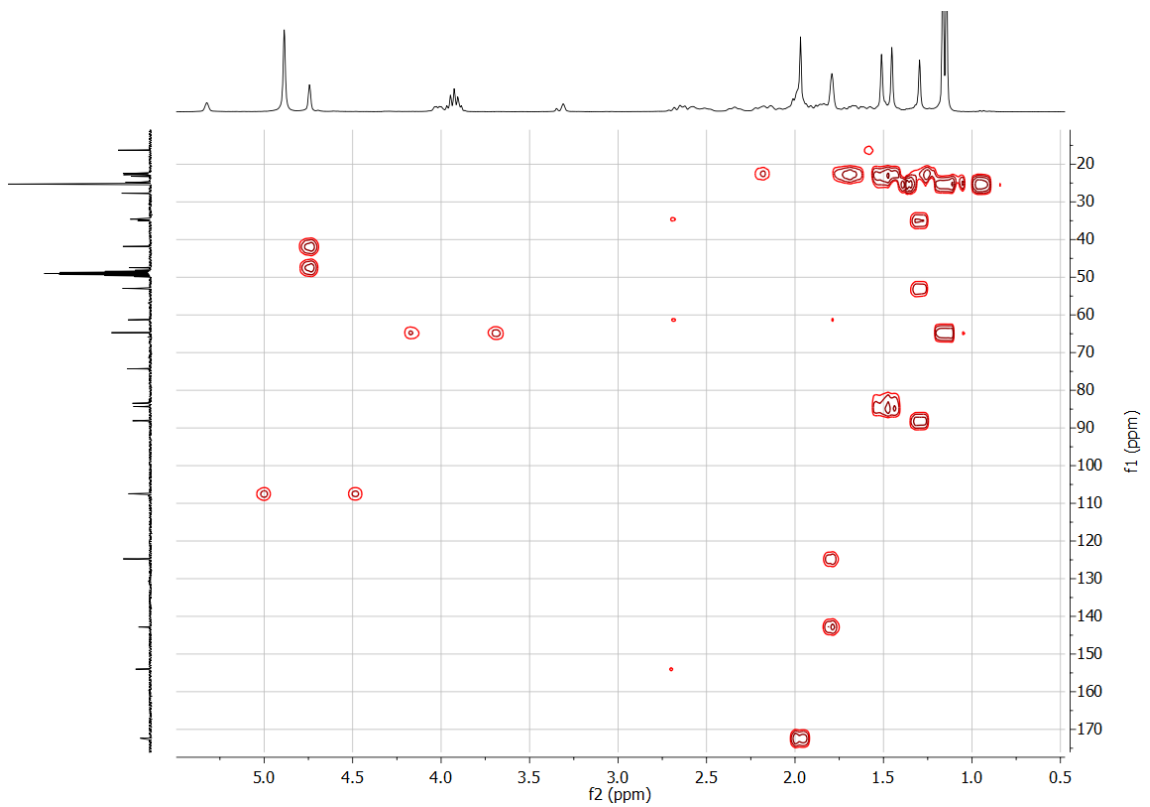


APÊNDICE 2A – Espectro RMN ^{13}C -APT do composto DM-02

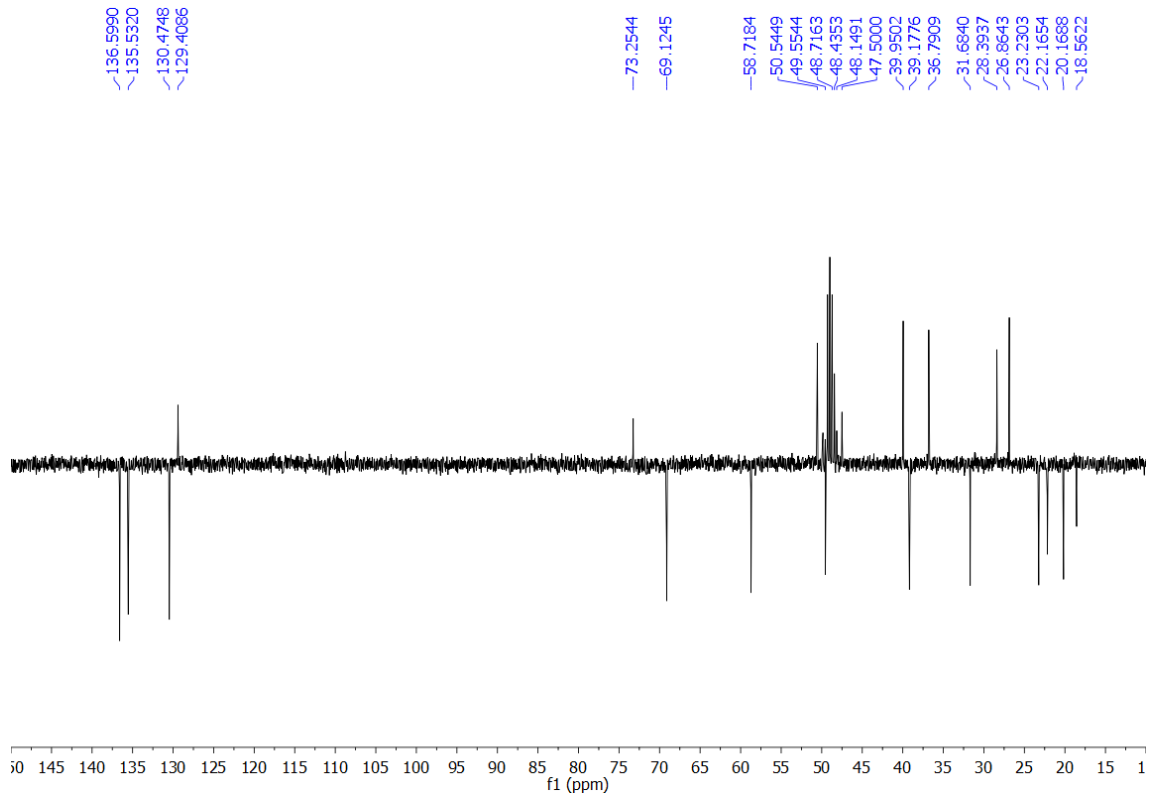


APÊNDICE 2B – Espectro HMQC do composto DM-02**APÊNDICE 2C – Espectro HMBC do composto DM-02**

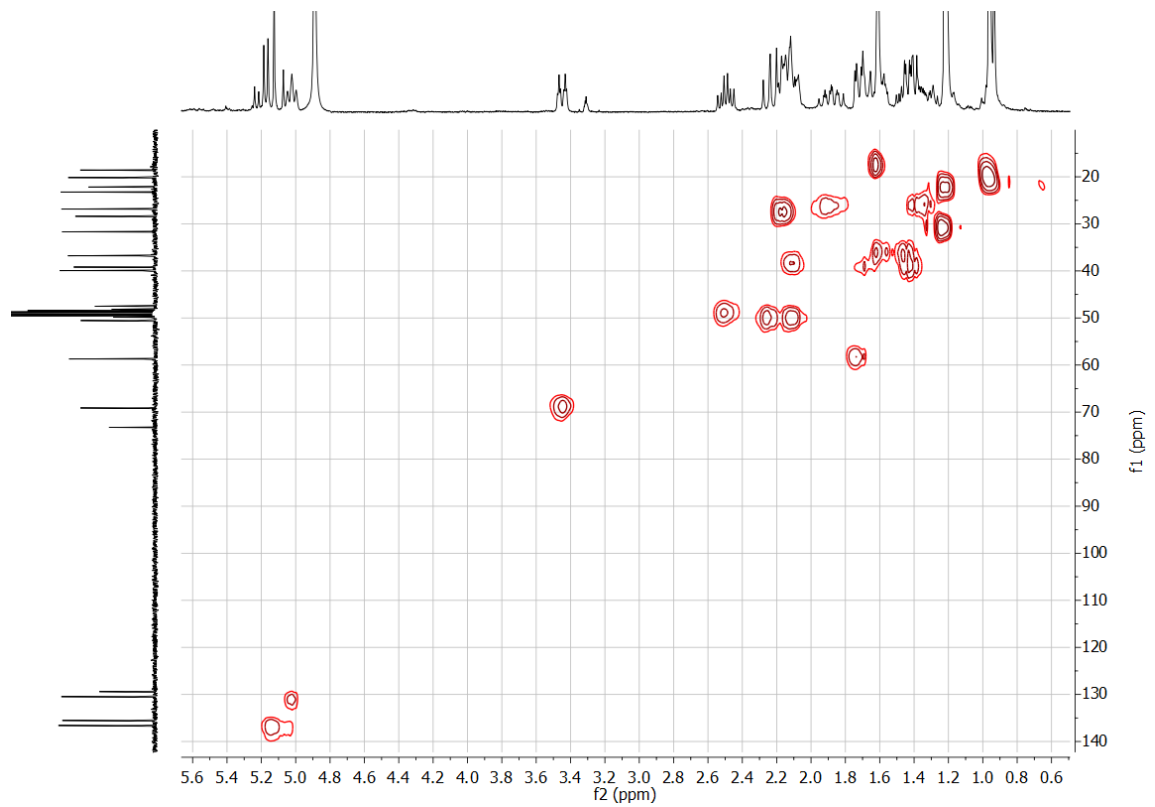
APÊNDICE 3A – Espectro HMQC do composto DM-03**APÊNDICE 3B – Espectro HMBC do composto DM-03**

APÊNDICE 4A – Espectro HMQC do composto DM-04**APÊNDICE 4B – Espectro HMBC do composto DM-04**

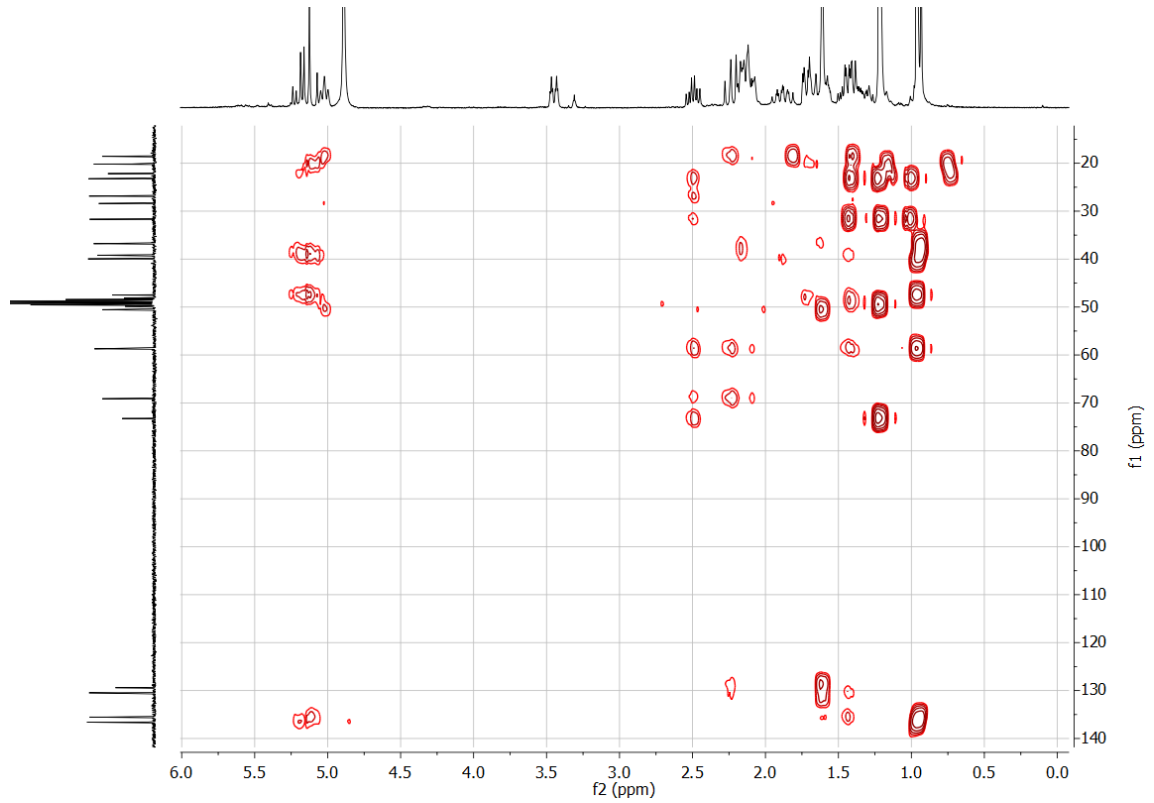
APÊNDICE 5A – Espectro RMN ^{13}C -APT do composto DM-05



APÊNDICE 5B – Espectro HMQC do composto DM-05

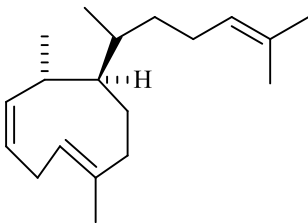


APÊNDICE 5C – Espectro HMBC do composto DM-05

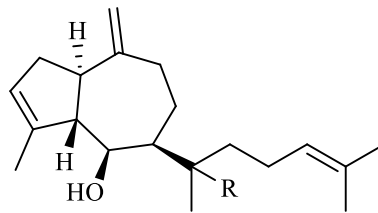


APÊNDICE 6 – Diterpenos de esqueleto xenicano, guaiano e dolabelano

Xenicano



Guaiano



Dolabelano

