

# Perfil Químico por CLUE-EMAR e Atividade Antifúngica e Antioxidante da Macroalga Marinha *Dictyota menstrualis*

## Chemical Profile by UPLC-HRMS and Antifungal and Antioxidant Activity of Marine Macroalgae *Dictyota menstrualis*

Thalísia C. dos Santos,<sup>a,b</sup> Johanna M. C. Obando,<sup>b</sup> Roberto C. C. Martins,<sup>a</sup> Marina A. Alves,<sup>a</sup> Roberto C. Villaça,<sup>c</sup> Levi P. Machado,<sup>d</sup> Maria Cândida de G. Gasparoto,<sup>e</sup> Diana N. Cavalcanti<sup>b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisa em Produtos Naturais Walter Mors, CEP 21941-599, Rio de Janeiro-RJ, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Laboratório de Produtos Naturais de Algas Marinhas (ALGAMAR); CEP 24210-130, Niterói-RJ, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Marinha e Ambientes Costeiros, CEP 24210-130, Niterói-RJ, Brasil.

<sup>d</sup> Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMaR); Departamento de Engenharia de Pesca, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, CEP 01001-900, São Paulo-SP, Brasil.

<sup>e</sup> Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira, CEP 11900-000, São Paulo-SP, Brasil.

\*E-mail: [dn.cavalcanti@gmail.com](mailto:dn.cavalcanti@gmail.com)

Recebido em: 16 de Fevereiro de 2023

Aceito em: 29 de Junho de 2023

Publicado online: 6 de Setembro de 2023

The brown macroalgae *Dictyota menstrualis* constitutes an organism with a rich and diverse metabolism in terms of the chemistry of natural products. It is known to mainly produce diterpenes, in addition to sterols, vitamins and polysaccharides with antiviral, anti-inflammatory, anticoagulant and antioxidant properties. Despite its vast metabolic arsenal, most studies are directed to the identification of already known diterpenes, opening the field of investigation for new approaches and discoveries. Knowing this, this work aims to chemically characterize the macroalgae *D. menstrualis* through the technique of Ultra Efficiency Liquid Chromatography associated with High-Resolution Mass Spectrometry (UPLC-HRMS) and perform a biological screening of potential antioxidants and antifungals through bioautography. For this, specimens of *D. menstrualis* were collected in the São Pedro São Paulo Archipelago (PE, Brazil) and attended to ingestion with dichloromethane and fractionation by column chromatography with silica gel. The extract and fractions were then analyzed by UPLC-HRMS with ElectroSpray Ionization (ESI) in positive mode. In addition, bioautography assays were performed to evaluate the antioxidant potential with DPPH and the antifungal potential against the *Cladosporium sphaerospermum*. The UPLC-HRMS analyzes allowed identifying diterpenes, sterols, fatty acids, glycerolipids, derivatives of photosynthetic pigments and carotenoids. Bioautography assays suggested antifungal and antioxidant potential of the organic extract and fractions. Thus, the results suggest that *D. menstrualis* has pharmacological potential to be explored and that studies on its chemical composition using modern techniques such as UPLC-HRMS can lead to the discovery of new structures and reinforcement of the knowledge of the chemistry of this algae.

**Keywords:** Ochrophyta; Dictyotaceae; diterpenos; sterols; UPLC-HRMS; bioautography

## 1. Introdução

A família *Dictyotaceae* (ordem *Dictyotales*, divisão Ochrophyta) agrupa cerca de 349 espécies de algas subdivididas em 19 gêneros, sendo um dos grupos mais representativos da classe Phaeophyceae.<sup>1-2</sup> A maioria das espécies (cerca de 64%) pertencem aos gêneros *Dictyota*, *Lobophora* e *Padina*<sup>1</sup> e ocupam principalmente os mares tropicais e subtropicais. O gênero *Dictyota* compreende cerca de 97 espécies,<sup>1</sup> distribuídas predominantemente pelos mares tropicais e temperados quentes. A sua abundância pode variar de acordo com fatores bióticos e abióticos como temperatura, luz e concentração de nutrientes.<sup>3</sup>

No que tange a composição química destas algas, são descritos diversos metabólitos secundários, principalmente diterpenos.<sup>4-5</sup> Esta classe de compostos, possuem esqueleto com 20 carbonos e são biossintetizados a partir da via do mevalonato, ou da via fosfato de metileritritol, originados pela união de unidades isoprenos (isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAPP))<sup>6</sup>. Uma rota biogênica foi proposta para formação dos esqueletos químicos dos diterpenos encontrados nestas algas, que indicou a formação de três grupos químicos (I-III) resultantes da ciclização do geranyl-geranylpirofosfato.<sup>7-8</sup>

Espécies de *Dictyota* têm demonstrado propriedades farmacológicas importantes, tais como: antivirais,<sup>9-14</sup> antibacteriano,<sup>15</sup> antitumoral,<sup>16-17</sup> antiinflamatório,<sup>18-21</sup> e efeitos antioxidantes.<sup>22-23</sup> Apesar do vasto potencial dos diterpenos produzidos pelas macroalgas do gênero *Dictyota*, diversos outros compostos como esteróis, ácidos graxos e polissacarídeos têm sido identificados. Os esteróis coprostanol, campesterol, estigmasterol, epicoprostanol e 5β-colestan-3-ona foram isolados da alga *D. dichotoma* apresentaram inibição contra várias cepas bacterianas.<sup>24</sup>

Alguns autores têm apontado ação antioxidante dos metabólitos produzidos por espécies de *Dictyota*<sup>25-27</sup>. Recentemente, a alga *D. maxima* foi sugerida como fonte de compostos com propriedades antioxidantes.<sup>25</sup> O diterpenoide de esqueleto guaiano prenilado, dictyol C isolado de *Dictyota* sp., foi registrado como produto antioxidante.<sup>26</sup> Já Tariq e colaboradores (2015), registraram efeito de eliminação de radicais livres em frações ricas em polissacarídeos advindas da espécie *D. dichotoma*<sup>27</sup>, enquanto Mekinić et al. (2021) associou a bioatividade ao conteúdo fenólico desta alga.<sup>28</sup>

Ademais, autores relatam que terpenos advindos de macroalgas podem desempenhar ação contra os fungos fitopatogênicos *Cladosporium sphaerospermum* e *Colletotrichum lagenarium*<sup>29</sup>. Os extratos diclorometânico e metanólico da espécie *D. bartayresiana* apresentaram ação antifúngica contra *Candida albicans*.<sup>30</sup> Extratos e frações obtidos da alga *D. acutiloba* exibiram atividade antimicrobiana contra os fungos *C. albicans* causador de diversas patologias em humanos e *Aspergillus niger* causador de contaminação em frutas e leguminosas.<sup>31</sup> Diterpenos de esqueleto xeniano obtidos de *D. ciliolata* também apresentaram ação contra *C. albicans*.<sup>32</sup>

Dado o potencial biotecnológico de macroalgas do gênero *Dictyota*, este trabalho tem como objetivo caracterizar quimicamente o extrato orgânico e frações da macroalga *D. menstrualis* através da técnica de Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência associada à Espectrometria de Massas de Alta Resolução (CLUE-EMAR) e realizar a triagem biológica dos potenciais antioxidante e antifúngico através da técnica de bioautografia-CCD.

## 2. Experimental

### 2.1. Materiais e equipamentos

Solventes de grau P.A. hexano (HEX), acetona, éter de petróleo, acetato de etila (AcOEt), clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) da marca Tedia<sup>®</sup> foram utilizados para extração e cromatografias em coluna e em camada delgada. Para o preparo de amostras e análises de CLUE-EMAR utilizou-se acetonitrila (ACN) grau HPLC da marca Tedia<sup>®</sup>. A concentração dos extratos foi efetuada sob pressão reduzida usando-se evaporador rotativo da marca Büchi<sup>®</sup> R-114. Para cromatografia sob pressão utilizou-se como fase estacionária gel de sílica 230-400 mesh, da marca Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

Para CCD utilizou-se cromatoplas de gel de sílica em suporte de alumínio da marca Merck<sup>®</sup> tamanho médio de partícula de 10-12 µm e marcador de fluorescência a 254nm. Como método de revelação física não-destrutiva das amostras de CCD foi utilizada irradiação com a lâmpada ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 356 nm. Como métodos de revelação química das amostras analisadas por CCD foram utilizados como reagentes:

solução acidificada de sulfato cérico (0,2%, p/v) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e posterior etapa de aquecimento a 100 °C em placa em manta aquecedora IKA<sup>®</sup> C-MAG HS. Ademais, para o teste de avaliação de atividade antioxidante foi utilizado como reagente solução metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (2%, p/v) (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram obtidos no Laboratório Multiusuário de RMN da Universidade Federal Fluminense (LaReMN-UFF), em espectrômetros Varian<sup>®</sup> VNMRs (500 MHz para <sup>1</sup>H). Utilizou-se como solvente para as amostras CDCl<sub>3</sub> e o Tetrametilsilano (TMS) foi usado como referência interna. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz). As áreas relativas dos sinais foram obtidas por integração eletrônica, a calibração dos espectros foi obtida a partir do sinal do TMS. O processamento dos espectros foi realizado utilizando o *software* MestReNova versão 6.0.2.

As análises por CLUE-EMAR foram realizadas com um cromatógrafo líquido Dionex UltiMate 3000 UHPLC da Thermo Scientific<sup>®</sup> empregando uma coluna Zorbax<sup>®</sup> Eclipse plus C18 (2,1mm x 50mm x 1,8 µm) mantida a 40 °C. O sistema foi acoplado a um espectrômetro de massa híbrido Quadrupolo-Orbitrap, modelo Q-Exactive Plus (Thermo Scientific<sup>®</sup>), com uma fonte de ionização por eletrospray operando no modo de ionização positivo na faixa *m/z* de 100-1000 Da. O processamento dos espectros foi realizado utilizando o *software* FreeStyle da versão 1.8 SP2 (Thermo Scientific<sup>®</sup>).

### 2.2. Material biológico

Os espécimes da alga *D. menstrualis* foram coletados por mergulho autônomo em profundidades entre 21 e 24 metros de profundidade na Enseada do Arquipélago de São Pedro São Paulo (0°55'02.0"N e 29°20'42.0"O) no Estado de Pernambuco (PE, Brasil), em junho de 2017. As algas foram triadas e limpas cuidadosamente com auxílio de lupa, pinças, bandeja e água do mar, para retirada de epífitas e epibiontes e plena separação das espécies alvo do estudo, processos realizados no campo. Posteriormente, o material biológico foi seco à temperatura ambiente, acondicionado em caixas térmicas e transportado para o laboratório de Produtos Naturais de Algas Marinhas da UFF (ALGAMAR). Em seguida as algas foram identificadas e depositadas no Herbário Prof. Jorge Pedro Pereira Carauta da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro.

### 2.3. Preparação do extrato orgânico e fracionamento

Um peso conhecido da alga *D. menstrualis* (64,21 g) foi extraído exaustivamente com DCM (1000 mL) (100%) durante quatro semanas, renovando o solvente a cada semana, para obter extrato orgânico. A evaporação do solvente foi realizada sob pressão reduzida com auxílio de evaporador rotatório com aquecimento de 40 °C. O extrato

foi analisado por CCD, RMN DE  $^1\text{H}$ , CLUE-EMAR e então submetido a processos de fracionamento por cromatografia em coluna de adsorção em gel de sílica, utilizando vários sistemas de eluentes (Tabela 1). O monitoramento do isolamento dos componentes foi feito por análises por cromatografia em camada CCD e por análise de RMN de  $^1\text{H}$ .

Análises de RMN de  $^1\text{H}$  foram realizadas para identificação do perfil de diterpenos do extrato e frações, uma vez que o grupo de pesquisa ALGAMAR detém de um banco de informações de RMN dos componentes majoritários de diversas algas do gênero *Dictyota*. Após as análises de CCD e RMN de  $^1\text{H}$ , as frações das colunas foram reunidas por similaridade química, sendo selecionadas para o estudo de triagem biológica as seguintes frações: DMC2F4-6 obtida a partir da coluna 2, DMC3F1-6, DMC3F8-12, DMC3F13-14 e DMC3F18 obtidas a partir da coluna 3 e DMPF6-18 obtida a partir da coluna 4 (Figura 1).

#### 2.4. Análise do perfil químico por CLUE-EMAR

Para as análises de CLUE-EMAR-IES, cada amostra foi preparada na concentração de 1 mg/mL em ACN com solução de 1  $\mu\text{L}$  do padrão interno 3-fluorofenilalanina (1mg/mL) sob agitação em misturador de vórtice. As amostras foram centrifugadas a 12.500 rotações por minutos (RPM) durante 1,5 min para remoção de partículas e os sobrenadantes transferidos para vials. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna analítica de fase reversa com uma taxa de fluxo fixada em 0,3 mL/min. A coluna foi mantida a 40 °C, o volume de amostra injetado foi de 5  $\mu\text{L}$  e a temperatura do amostrador automático foi mantida a 4 °C.

Um gradiente de eluição envolvendo uma programação binária de água acidificada (0,1% de ácido fórmico, v/v) e ACN foi aplicado. O gradiente de eluição começou com 35% de ACN e foi mantido por 5 min, depois atingiu 100% de ACN (rampa linear) em 8 min e foi mantido até os 19 min; em seguida, voltou a 35% ACN e foi mantido por 2,9 min, para um tempo total de execução de 22 min. A aquisição dos espectros de massas (EM) foi realizada

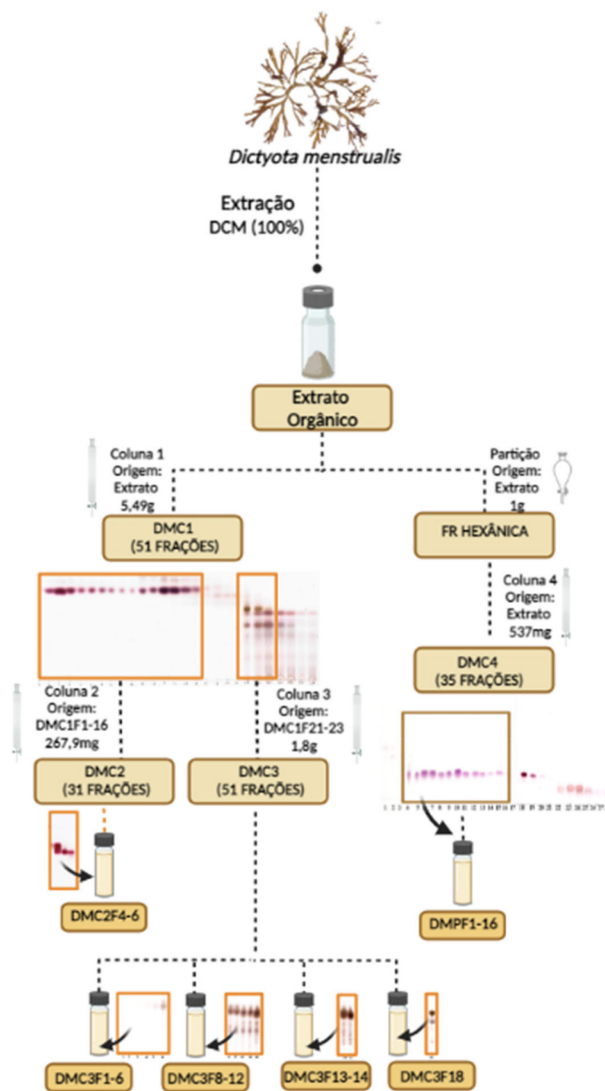


Figura 1. Esquema de fracionamento do extrato diclorometânico da macroalga *D. menstrualis*

nos modos de ionização positiva e negativa e faixa de varredura completa ( $m/z$  100 a 1000). Os dados brutos foram analisados com *software* FreeStyle®, extraindo os tempos

Tabela 1. Condições cromatográficas usadas no fracionamento do extrato diclorometânico da alga *D. menstrualis*

Coluna	Origem	Massa	Frações	Condições da coluna
Coluna 1 (DMC1)	Extrato orgânico	5,49 g	51	Cromatografia em coluna tipo <i>flash</i> em gel de sílica (230-400 Mesh) (Ø6 cm x altura da coluna 40 cm). Fase móvel: 400mL de HEX (100%); 450 mL de DCM (100%); 350 mL de AcOEt (100%); 350 mL de Acetona e 100 mL de MeOH.
Coluna 2 (DMC2)	DMC1F1-6	267,9 mg	31	Cromatografia em coluna tipo <i>flash</i> em gel de sílica (230-400 Mesh) (Ø2 cm x altura da coluna 16 cm). Fase móvel: 200 mL de HEX:AcOEt (7:3) e 100 mL AcOEt (100%).
Coluna 3 (DMC3)	DMC1F21-23	1,80 g	51	Cromatografia em coluna tipo <i>flash</i> em gel de sílica (230-400 Mesh) (Ø5 cm x altura da coluna 25 cm). Fase móvel: 300 mL de Éter de petróleo:AcOEt (8:2); 300 mL de Éter de petróleo:AcOEt (7:3) e 200 mL de Éter de petróleo:AcOEt (6:4).
Coluna 4 (DMPF)	Fração hexânica do extrato orgânico	537,0 mg	35	Cromatografia em coluna tipo <i>flash</i> em gel de sílica (230-400 Mesh) (Ø2 cm x altura da coluna 20 cm). Fase móvel: 200 mL de HEX:DCM (7:3); 200 mL DCM (100%); 100 mL de AcOEt (100%) e 100 mL de acetona.

de retenção (TR), abundância relativa e  $m/z$ . Os compostos foram identificados usando como referência dados do PubChem e *Comprehensive Marine Natural Products Database* (CMNPD) com base em suas respectivas fórmulas calculadas, tempos de retenção, padrões de fragmentação EM e comparação com dados da literatura.

## 2.5. Triagem biológica por bioautografia

Neste trabalho foi realizada a triagem biológica pelo método de bioautografia para avaliação das atividades: a) antioxidante pela técnica CCD-DPPH e b) antifúngica contra o fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum*. Para isso, realizou-se o preparo de soluções do extrato orgânico nas concentrações 0, 1, 3 e 5 mg/L em DCM para o ensaio CCD-DPPH e foi realizado ensaio de atividade antioxidante do extrato diclorometânico nas concentrações 0, 1, 3, 5 e 10 mg/L para o ensaio de atividade antifúngica. Ademais, as frações DMPF6-18, DMC2F4-6, DMC3F1-6, DMC3F8-12, DMC3F13-14 e DMC3F18 foram selecionadas para os ensaios de bioautografia, sendo preparadas as soluções na concentração de 1 mg/mL em DCM.

Os ensaios consistiram na aplicação de alíquotas de 15  $\mu$ L de cada solução fazendo uso de capilar volumétrico. A aplicação das amostras foi realizada nas placas de gel de sílica (10 cm x 10 cm, espessura de 0,20 mm) em triplicata. As cromatoplasmas foram eluídas com o sistema de solvente HEX:AcOEt (7:3) e posteriormente submetidas à revelação com (i) reagente DPPH ou (ii) com suspensão de esporos do fungo *C. sphaerospermum*. Para a determinação do perfil cromatográfico do extrato e frações realizou-se a CCD com o mesmo sistema de solventes dos ensaios de bioautografia e revelação com solução acidificada de sulfato cérico (0,2%, p/v).

### 2.5.1. Teste CCD-DPPH para triagem de frações antioxidantes

Foi realizado ensaio de atividade antioxidante do extrato diclorometânico nas concentrações 0, 1, 3, 5 mg/L. Após a eluição da cromatoplasma, a CCD foi submetida à revelação com solução metanólica de DPPH na concentração de 2% (p/v). A placa foi mantida em ambiente escuro por 30 min. O mesmo ensaio foi realizado para as frações DMPF6-18, DMC2F4-6, DMC3F1-6, DMC3F8-12, DMC3F13-14 e DMC3F18 na concentração de 1 mg/mL. A validação do método foi realizada para o controle positivo  $\alpha$ -tocoferol (Informação suplementar).

### 2.5.2. Avaliação da atividade antifúngica

Os isolados do fungo *Cladosporium sphaerospermum* (Penz.) foram obtidos em parceria com o Instituto Biológico de São Paulo por meio da Micoteca de Fungos Fitopatogênicos „Mário Barreto Figueiredo“. As matrizes do fungo foram cultivadas em meio BDA (batata, dextrose e ágar) (Difco®). Os fungos foram repicados por meio de retirada de discos de 5 cm de diâmetro e inoculados em

placas contendo meio de cultura estéril. Estas placas foram incubadas posteriormente em uma estufa sem fotoperíodo a uma temperatura de  $27 \pm 2^\circ\text{C}$  durante uma semana, tempo suficiente para a colonização de toda área da placa contendo o meio de cultura.

A partir destas colônias, foi realizada a extração de conídios por meio da raspagem do micélio com auxílio de alça de platina e dissolução em água destilada, sendo realizada uma agitação mecânica para que os esporos fossem liberados do micélio com posterior filtragem em gaze estéril. Essa suspensão filtrada teve a concentração avaliada por contagem em câmara de Neubauer com unidade expressa em conídios/mL e conservadas pelo método de Castellani.<sup>33</sup> Após o desenvolvimento dos cromatogramas, as placas foram secas em capela, em corrente de ar e nebulizadas com suspensão de glicose e sais (6:1) contendo esporos de *C. sphaerospermum* dos fungos, na concentração de  $10^8$  esporos/mL. A seguir, as placas foram incubadas em câmara úmida a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ , por 72 h.

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Fracionamento do extrato orgânico da macroalga *D. menstrualis*

A macroalga *D. menstrualis* é considerada uma espécie promissora no que tange à complexidade química e importância farmacológica de seus metabólitos. Para investigar a composição química desta espécie realizou-se a extração com DCM (massa obtida: 6,49g; rendimento: 10,1%) e fracionamento através de técnicas de cromatografia de adsorção em coluna (Figura 1). Primeiramente, uma alíquota do extrato (5,49 g) foi submetida ao fracionamento (DMC1) utilizando sílica gel, onde foram obtidas um total de 51 frações, que posteriormente foram analisadas por CCD. Em seguida, as frações foram agrupadas de acordo com a similaridade no padrão cromatográfico: F1-16 (267,9 mg); F21-23 (1,8 g) e F24-26 (964,7 mg).

A fração F1-16 (267,9 mg) foi submetida à cromatografia de adsorção em coluna (DMC2) gerando 31 frações. As análises de RMN de  $^1\text{H}$  das frações F4-F6 indicaram a presença de diterpenoides de esqueleto guaiano prenilado como Dictyol E, sugerido como um produto majoritário em espécies de *D. menstrualis* coletadas no Arquipélago São Pedro São Paulo.<sup>34</sup> Esta fração foi selecionada para avaliação do perfil químico e triagem biológica.

Posteriormente, uma alíquota de 1,8g da fração DMC1F21-23 foi utilizada para fracionamento por cromatografia em coluna (DMC3), gerando 51 frações. Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  indicaram a presença de hidrogênios característicos de grupamentos oxigenados, metilas e metilenos. As frações DMC3F8-12, DMC3F13-14 e DMC3F18 apresentaram sinais característicos de compostos de esqueleto xeniano e dicotomano, substâncias essas que têm demonstrado várias atividades biológicas.<sup>35</sup> Estas



frações, foram selecionadas para triagem por bioautografia. Além disso, a fração DMC3F1-6 foi selecionada para análise por CLUE-EMAR e triagem biológica.

Ademais, uma alíquota do extrato bruto de *D. menstrualis* (1,0 g) foi submetida a um processo de partição líquido-líquido com os solventes n-hexano e mistura de MeOH:água (1:1). A partição gerou duas frações: fração hexânica e fração hidrometanólica. A fração hexânica (537,0 mg) foi submetida a um processo de cromatografia em coluna de gel de sílica gerando 35 frações, das quais as frações F6-18 (57 mg) apresentaram o padrão cromático em CCD de diterpenos guaiano prenilado.<sup>35</sup> As análises de RMN de <sup>1</sup>H confirmaram a presença dos diterpenos Pachydictyol A e Isopachydictyol A, que são característicos de algas do gênero *Dictyota*.<sup>4</sup> A amostra foi selecionada para o estudo de triagem por CCD-DPPH e avaliação do potencial antifúngico.

### 3.2. Análise do perfil químico por CLUE-EMAR

A técnica de CLUE-EMAR foi desenvolvida para superar os desafios da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, permitindo análises em maior velocidade, sensibilidade e resolução.<sup>36</sup> Esta técnica tem sido aplicada com sucesso em pesquisas de produtos naturais, permitindo a separação e caracterização através da espectrometria de massas, de compostos bioativos em misturas complexas.<sup>37-38</sup>

No presente estudo, foi desenvolvido um método de CLUE-EMAR simples e rápido para a identificação dos principais constituintes no extrato orgânico e frações de *D. menstrualis* e posteriormente correlacionar com suas atividades biológicas. Para isso, uma alíquota do extrato orgânico e das frações DMPF6-18, DMC2F4-6, DMC3F1-6, DMC3F8-12, DMC3F13-14, DMC3F18 foram submetidos a análises por CLUE-EMAR o qual permitiram identificar compostos pertencentes a classe dos esteróis, diterpenos, ácidos graxos e acilgliceróis (Tabela 2). As estruturas

moleculares dos compostos identificados são apresentados na Figura 2.

A fim de se obter um panorama geral da composição química do extrato diclorometânico e das frações DMPF6-18, DMC2F4-6, DMC3F1-6, DMC3F8-12, DMC3F13-14 e DMC3F18, realizou-se a quantificação dos principais metabólitos identificados. Para isso, os dados de integração correspondentes às abundâncias relativas dos picos identificados foram obtidos através do software *FreeStyle* e apresentados através do gráfico de barras (Figura 3).

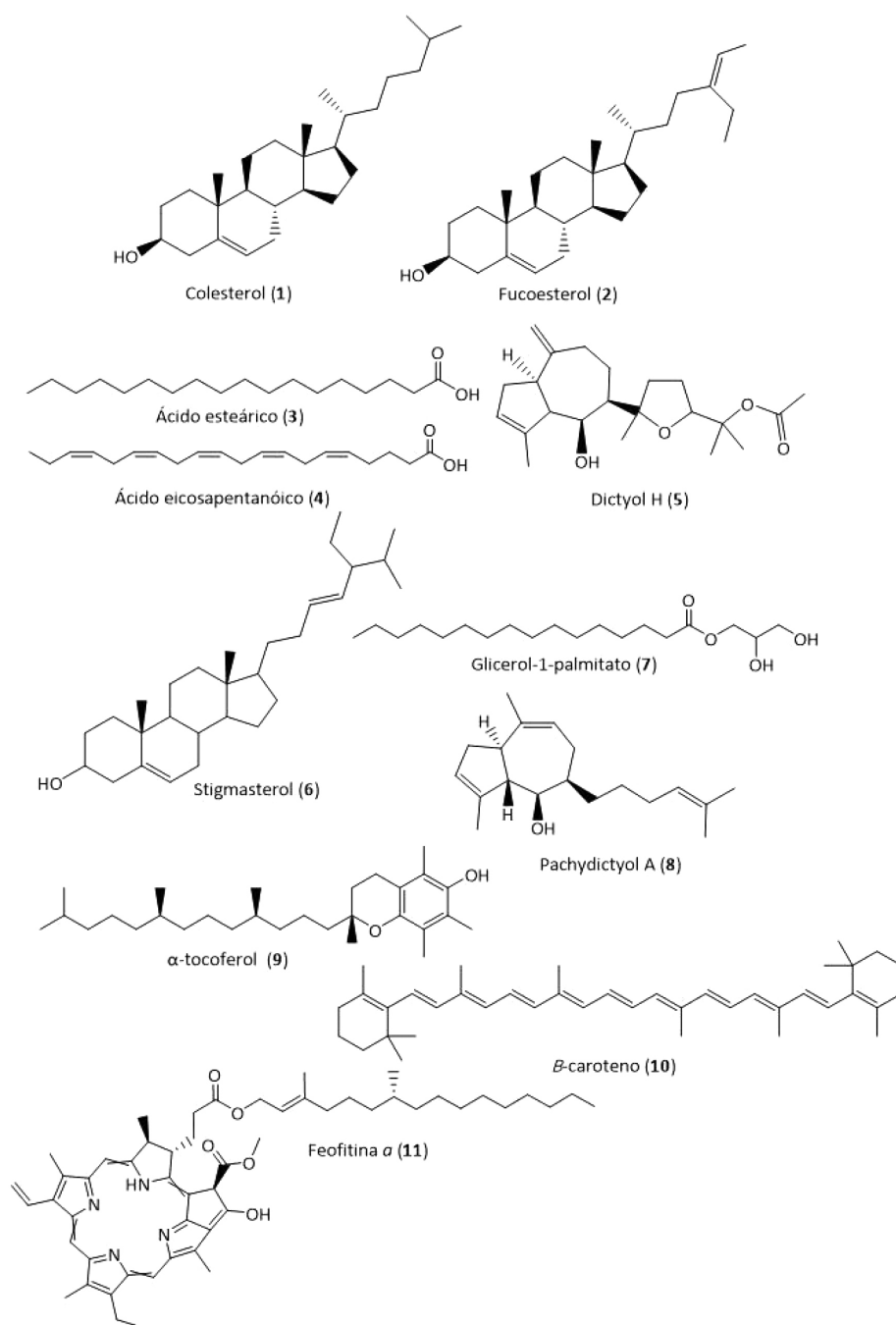
Atualmente, CLUE-EMAR tem sido aplicada em estudos de metabolômica de macroalgas marinhas para identificação de seus metabólitos.<sup>39-43</sup> Recentemente, a técnica foi usada para análise do perfil químico da alga verde *Halimeda gracilis*, o qual foi possível identificar diversos fenilpropanoides como o ácido ferúlico, ácido cumárico e ácido cafeico, compostos conhecidos pela atividade anticancerígena.<sup>44</sup> O perfil de florotaninos de macroalgas pardas dos gêneros *Ascophyllum*, *Pelvetia* e *Fucus* também foi determinado por CLUE-EMAR.<sup>45</sup>

Estudos sobre o perfil químico de *D. menstrualis* são descritos na literatura, sendo o mais recente sobre a avaliação da composição química de espécimes mantidas em condições de laboratório onde foi descrita a variação na produção de diterpenos ao longo de 120 e 180 dias de cultivo,<sup>35</sup> também têm se descrito a variação na produção de diterpenos de esqueleto tipo guaiano prenilado e xeniano, ácidos graxos, fucoesterol e colesterol de diferentes populações de *D. menstrualis*, incluindo populações coletadas no Arquipélago São Pedro São Paulo.<sup>34</sup> Além disso, há trabalhos focados no perfilamento de ácidos graxos para prospecção na área bioenergética.<sup>46</sup> Apesar disso, poucos são os relatos da descrição de outras classes de metabólitos como glicerolípídeos, tocoferóis e pigmentos em *D. menstrualis*.

No que tange ao uso da técnica CLUE-EMAR como

**Tabela 2.** Compostos identificados no extrato diclorometânico e frações da macroalga *D. menstrualis* obtidos nos espectros de massas por ionização em eletrospray no modo de ionização positivo. Classe de metabólitos: A: ácido graxo; C: carotenoides; D: diterpenos; E: esterol; G: glicerol-lípídeo; T: tocoferol e P: derivado de pigmento fotossintético

Tempo de retenção (TR)	Identificação	Classe	Fórmula molecular
3,22 min	Colesterol	E	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O
4,74 min	Fucoesterol	E	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O
5,82 min	Ácido esteárico	A	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>
6,12 min	Ácido eicosapentanoico	A	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>
6,50 min	Dictyol H	D	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>
6,70 min	Estigmasterol	E	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O
9,12 min	Glicerol-1-palmitato	G	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>
10,12 min	Pachydictyol A	D	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O
12,62 min	α-tocoferol	T	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>
14,02 min	β-caroteno	C	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>
14,74 min	Feofitina a	P	C <sub>55</sub> H <sub>74</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub>
19,22 min	Feofitina a dihidroxilada	P	C <sub>55</sub> H <sub>74</sub> O <sub>7</sub> N <sub>4</sub>



**Figura 2.** Compostos identificados no extrato diclorometânico e frações da macrolaga *D. menstrualis*

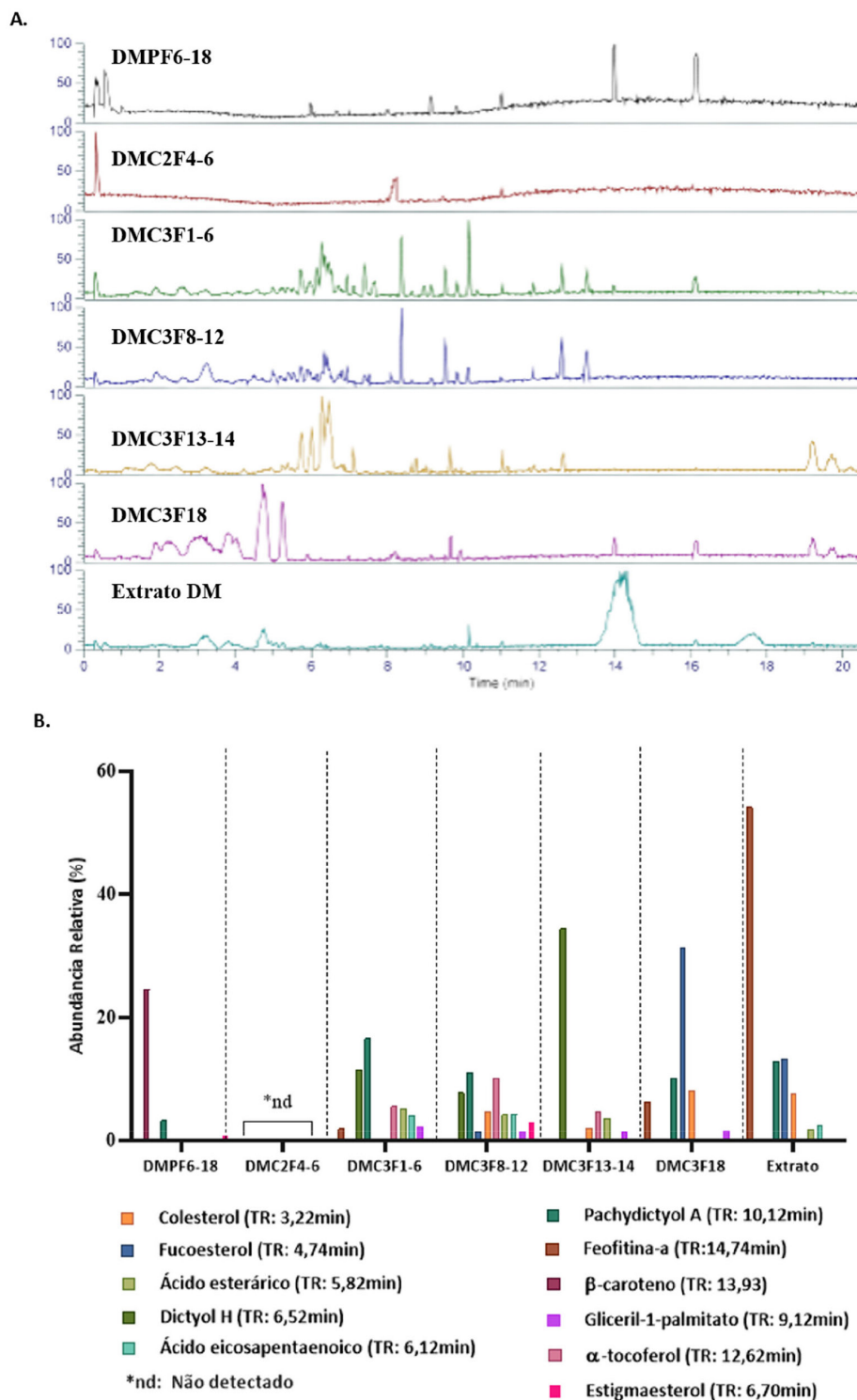
ferramenta de análise e identificação de metabólitos de *D. menstrualis*, há o relato do uso CLUE associada a um sistema quadrupolo/tempo de voo (TOF), o qual permitiu identificar novos diterpenos de esqueleto guaiano prenilado com propriedades anti-inflamatórias, o que evidencia a potencialidade da EMAR para novas descobertas sobre o metabolismo desta espécie.<sup>47</sup> Contudo, o artigo é focado na investigação química de diterpenos presentes no extrato hexânico e em acetato de etila, o que difere do presente trabalho.

Neste estudo foi possível identificar os metabólitos e prever os fragmentos principais. Os resultados revelaram

que a macroalga *D. menstrualis* coletada no Arquipélago São Pedro São Paulo apresenta diferentes produtos naturais como: esteróis, diterpenos, ácidos graxos, glicerolipídeos e derivados de pigmentos fotossintéticos. Dessa forma, a quimiodiversidade desta alga abre campos de investigação para novas descobertas sobre o seu perfil químico, que ainda é pouco explorado no que concerne a composição de outras classes de metabólitos secundários.

### 3.3. Triagem biológica por bioautografia

A bioautografia é um método que combina a separação por



**Figura 3.** A. Cromatogramas de pico base obtidos pela técnica CLUE-EMAR no modo positivo das frações DMPF6-18, DMC2F4-6, DMC3F1-6, DMC3F8-12, DMC3F13-14, DMC3F18 e do extrato diclorometânico da macroalga parda *D. menstrualis*. B. Gráfico de barras com uma comparação da abundância relativa (%) dos compostos identificados em frações e extrato diclorometânico da macroalga parda *D. menstrualis*

CCD com a determinação da atividade biológica para avaliar propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes e atividade inibitória enzimática das substâncias analisadas, permitindo a rápida identificação de compostos bioativos em amostras de multicomponentes.<sup>48</sup> Recentemente, a técnica

de bioautografia foi aplicada para avaliação de propriedades antifúngicas de produtos naturais de macroalgas vermelhas do gênero *Ochtodes*.<sup>29</sup> O teste também foi aplicado para avaliação fungitóxica de sesquiterpenos obtidos da espécie *Laurencia dendroidea* contra o fungo causador de

doenças pós-colheita *Colletotrichum lagenarium*, os quais demonstraram efeito na inibição do seu crescimento.<sup>49</sup>

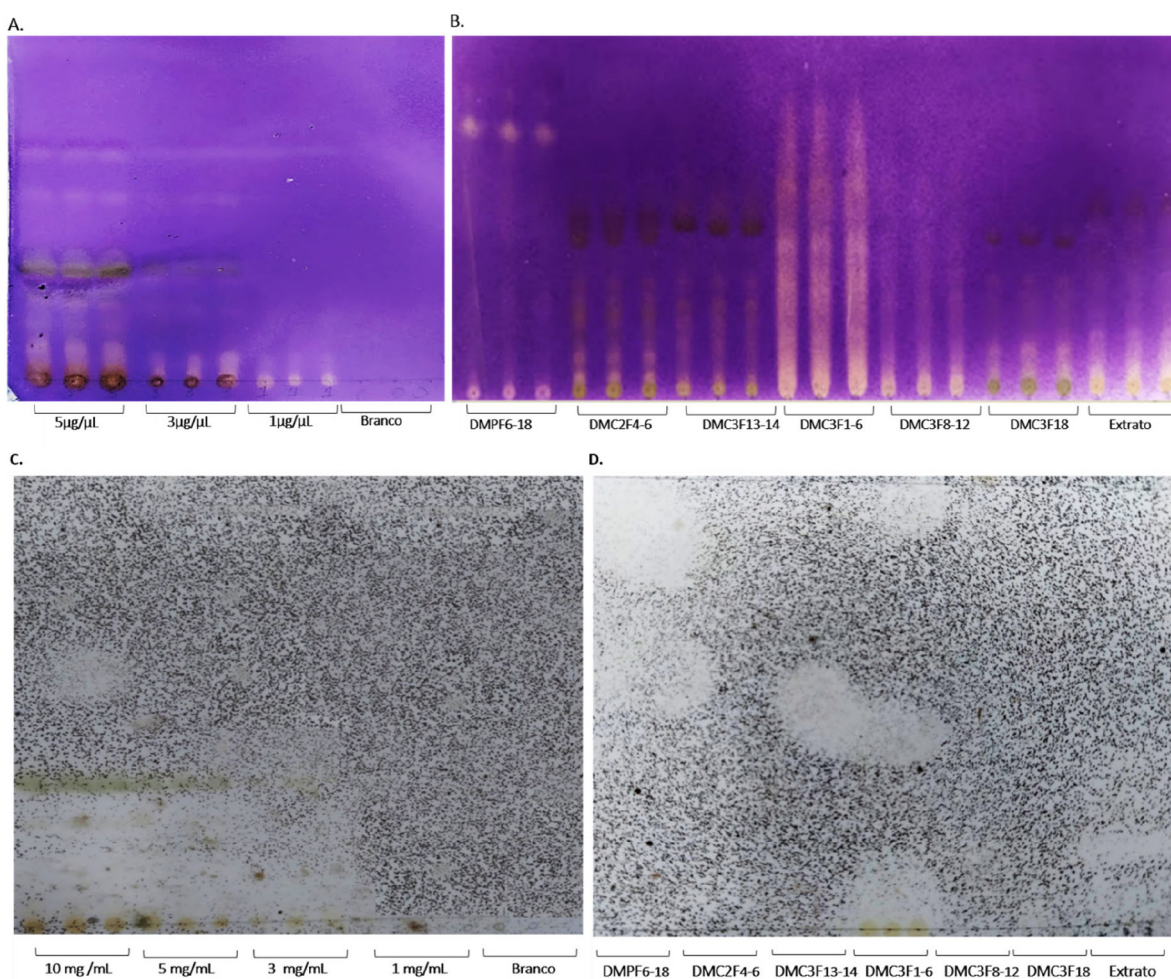
Além da identificação de metabólitos com ação antifúngica, a bioautografia pode ser aplicada para avaliar o potencial antioxidante revelando a cromatoplaça com solução de DPPH.<sup>50</sup> Substâncias antioxidantes geram manchas clareadas contra um fundo roxo indicando a presença de compostos sequestradores de radicais livres.<sup>51</sup>

A avaliação do potencial antioxidante de diferentes concentrações (5, 3, 1, e 0 mg/mL) (Figura 4A) do extrato de *D. menstrualis* sugeriu apresenta ação antioxidante evidenciada pelo descolorimento de diversas bandas na placa quando em contato com o reagente DPPH. Os resultados do ensaio sugeriram a presença de compostos com potencial antioxidante com RFs na faixa de 0,18-0,29. A literatura descreve a presença de diterpenos de esqueleto xeniano e dicotomano nesta faixa de RF, sugerindo que as manchas observadas podem ser estes metabólitos os responsáveis

pela atividade observada.<sup>34-35</sup> A atividade foi detectada para as concentrações de 1, 3, 5 mg/mL.

O ensaio foi reproduzido para as frações DMPF6-18, DMC2F4-6, DMC3F1-6, DMC3F1-8, DMC3F13-14 e DMC3F18 (Figura 4B). Os resultados indicam que todas as frações apresentam algum efeito antioxidante observado através da presença de zonas de clareamento em diferentes faixas de RF. No entanto, a fração DMC3F1-6 (+++) gerou maior clareamento na placa cromatográfica quando comparada com as demais frações (Tabela 3). Sua bioatividade pode ser relacionada à sua grande diversidade química evidenciada pela análise CLUE-EMAR e a presença de compostos como Dictyol H, Pachydictyol A,  $\alpha$ -tocoferol e ácidos graxos. Vale destacar que o composto  $\alpha$ -tocoferol, relatado como componente com atividade antioxidante foi usado como controle positivo para avaliação dia CCD-DPPH (Figura S21).

A fração DMC3F8-12 (++) apresentou o maior teor de



**Figura 4.** A. Cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato diclorometânico da macroalga *Dictyota menstrualis* nas concentrações 5 mg/mL (1°), 3 mg/mL (2°), 1 mg/mL (3°) e Branco (0 mg/mL) (4°) revelada com reagente DPPH. B. CCD das frações DMPF6-18 (1°); DMC2F4-6 (2°); DMC3F13-14 (3°); DMC3F1-6 (4°); DMC3F8-12 (5°); DMC3F18 (6°) e extrato diclorometânico de *Dictyota menstrualis* (7°) revelada com reagente DPPH. C. Bioautografia em CCD revelada com suspensão de esporos de *Cladosporium sphaerospermum* do extrato diclorometânico nas concentrações: 10 mg/mL (1°); 5 mg/mL (2°); 3 mg/mL (3°); 1 mg/mL (4°) e Branco (0 mg/mL) (5°). D. Bioautografia em CCD revelada com suspensão de esporos de *Cladosporium sphaerospermum* das frações DMPF6-18 (1°); DMC2F4-6 (2°); DMC3F13-14 (3°); DMC3F1-6 (4°); DMC3F8-12 (5°); DMC3F18 (6°) e extrato diclorometânico de *Dictyota menstrualis* (7°). CCD's eluídas no sistema de *n*-Hexano:Acetato de etila (7:3 v/v)



$\alpha$ -tocoferol quando comparado com as demais amostras, além de apresentar diterpenos, esteróis e ácidos graxos identificados. Já a fração DMC3F18 (++) apresentou o metabólito fucoesterol com abundância relativa superior a 20%, composto que tem sido descrito como agente antioxidante.<sup>52-54</sup> A presença destes metabólitos pode estar ligada às bioatividades observadas.

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada para o extrato diclorometânico nas concentrações 10, 5, 3, 1, e 0 mg/mL e para as frações DMPF6-18, DMC2F4-6, DMC3F1-6, DMC3F1-8, DMC3F13-14 e DMC3F18 na concentração de 1 mg/mL. (Tabela 4) à formação de manchas claras sobre o fundo escuro são indicativas da presença de substâncias com atividade antifúngica (Figuras 4C e 4D).

A fração DMC3F1-6 demonstrou a maior atividade antifúngica contra *C. sphaerospermum*, observada pelas zonas de inibição pronunciada em bandas com Rf na faixa de 0,2; 0,5 e 0,9. Conforme explicitado no item 3.1 deste artigo, DMC3F1-6 é caracterizada pela presença de diterpenos, ácidos graxos e  $\alpha$ -tocoferol que podem ser os responsáveis pela inibição observada. Já a fração DMPF6-18 inibiu o crescimento do fungo na região do Rf em 0,90-0,95. Segundo a literatura, os diterpenos Pachydictyol A e isopachydictyol A apresentam perfil cromatográfico nesta faixa identificados pelo padrão cromático de coloração rosa quando revelado com solução

de sulfato cérico.<sup>35</sup> Dessa forma, estes metabólitos podem estar envolvidos no mecanismo de inibição do crescimento de *C. sphaerospermum*.

Salienta-se que o teste de avaliação antifúngica por bioautografia é considerado um bioensaio padrão e reprodutível, o qual permite obter resultados qualitativos sobre o potencial antifúngico de misturas complexas, frações e produtos isolados.<sup>29</sup> A partir dos resultados apresentados, pode-se dizer que o método de bioautografia aplicado neste estudo permitiu a avaliação preliminar do potencial antifúngico do extrato e frações de *D. menstrualis*, possibilitando a triagem das frações mais ativas.

#### 4. Conclusões

Este trabalho permitiu ampliar o conhecimento do arsenal metabólico da *Dictyota menstrualis*, corroborando a presença de diterpenos, esteróis e ácidos graxos e também de classes como glicerolípídeos, carotenoides e derivados de pigmentos fotossintéticos pouco relatadas para este gênero. A detecção de um perfil que abrange vários grupos químicos só foi possível devido à versatilidade oferecida pelo método CLUE-EMAR.

O potencial antifúngico e antioxidante do extrato e as frações da alga *D. menstrualis* foram demonstrados usando técnica de bioautografia por CCD, que provou ser uma

**Tabela 3.** Valores do fator de retenção (Rf) e intensidade das manchas com potencial antioxidante determinadas pelo teste de bioautografia. Os extratos foram eluídos com os solventes *n*-Hexano:Acetato de etila (7:3 v/v), por cromatografia em camada delgada de sílica gel e revelada com solução metanólica de DPPH (2%, p/v). Intensidade da bioatividade: substancial (+ + +); Notável (+ +), Leve (+)

Extrato orgânico <i>D. menstrualis</i>			Frações obtidas de <i>D. menstrualis</i>		
	Intensidade	Rf		Intensidade	Rf
0 mg/mL	ND	ND	DMPF6-18	++	0/0,95
1 mg/mL	+	0/0,18/0,95	DMC2F4-6	+	0-0,18/0,28
3 mg/mL	+	0,18/0,58/0,95	DMC3F13-14	+	0-0,18/0,28/0,35
5 mg/mL	++	0,18/0,28/0,58/0,95	DMC3F1-6	+++	0-0,18/0,5/0,95
			DMC3F8-12	++	0,10
			DMC3F18	+	0,28
			Extrato <i>D. menstrualis</i>	+	0-0,18/0,27

**Tabela 4.-** Valores do fator de retenção (Rf) e intensidade das manchas com potencial antifúngico contra o fungo *Cladosporium sphaerospermum* determinadas pelo teste de bioautografia. Os extratos foram eluídos com os solventes *n*-Hexano:Acetato de etila (7:3 v/v), por cromatografia em camada delgada de sílica gel. Intensidade da bioatividade: substancial (+ + +); Notável (+ +), Leve (+)

Extrato orgânico <i>D. menstrualis</i>			Frações obtidas de <i>D. menstrualis</i>		
	Intensidade	Rf		Intensidade	Rf
0 mg/mL	ND	ND	DMPF6-18	++	0,95
1 mg/mL	ND	ND	DMC2F4-6	ND	ND
3 mg/mL	++	0,18	DMC3F13-14	ND	ND
5 mg/mL	++	0,18-0,35	DMC3F1-6	+++ / +++ / +++	0,02/0,5/0,9
10 mg/mL	+++	0-0,18 / 0,25-0,35/0,6	DMC3F8-12	ND	ND
			DMC3F18	ND	ND
			Extrato <i>D. menstrualis</i>	++	0,18/0,27

metodologia simples e eficaz para triagem preliminar de atividades biológicas de misturas complexas de algas marinhas do gênero *Dictyota*. Certamente, estudos biomonitoramento e isolamento devem ser propostos para analisar a ação individual e sinérgica dos metabólitos nas frações responsáveis pelas atividades biológicas.

## Informações Suplementares

Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H das frações e extrato da macroalga *Dictyota menstrualis* e os espectros de massas dos compostos identificados são disponibilizados na informação suplementar.

## Agradecimentos

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado (TCS). Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Subsídios nº E-26/211.069/2019, nº E-26/211.651/2021 e nº E-26/205.005/2022 (DNC).

## Referências Bibliográficas

- Guiry, M. D.; Guiry, G. M.; AlgaeBase. Disponível em: <https://www.algaebase.org/>. Acesso em 10 junho 2023.
- Theophilus, T.; Vieira, C.; Culioli, G.; Thomas, O. P.; Antoine De Ramon, N. Y.; Andréfouët, S.; Mattio, L.; Payri, E. C.; Zubia, M.; Dictyotaceae (Dictyotales, Phaeophyceae) species from French Polynesia: current knowledge and future research. *Advances in Botanical Research* **2020**, *95*, 163. [Crossref]
- Martins, A. P.; Yokoya, N. S.; Colepicolo, P.; Biochemical modulation by carbon and nitrogen addition in cultures of *Dictyota menstrualis* (Dictyotales, Phaeophyceae) to generate oil-based bioproducts. *Marine biotechnology* **2016**, *18*, 314. [Crossref][PubMed]
- 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* **2018**, *16*, 159. [Crossref][PubMed]
- Peng, Y.; Hu, J.; Yang, B.; Lin, X. P.; Zhou, X. F.; Yang, X. W.; & Liu, Y.; Em *Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Application*; Tiwari, B. K.; Troy, D. J., eds.; Academic Press: Cambridge, 2015, cap. 5. [Crossref]
- Zhou, F.; Pichersky, E.; More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **2020**, *55*, 1. [Crossref][PubMed]
- Teixeira, V. L.; Cavalcanti, D. N.; Pereira, R. C.; Chemotaxonomic study of the diterpenes from the brown alga *Dictyota menstrualis*. *Biochemical Systematics and Ecology* **2021**, *29*, 313. [Crossref][PubMed]
- 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* **2005**, *33*, 1. [Crossref]
- de Souza Pereira, H.; Leão-Ferreira, L. R.; Moussatché, N.; Teixeira, V. L.; Cavalcanti, D. N.; da Costa, L. J.; Diaz, R.; Frugulhetti, I. C. D. P. P.; Effects of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* on HIV-1 reverse transcriptase. *Planta medica* **2005**, *71*, 1019. [Crossref][PubMed]
- Abrantes, J. L.; Barbosa, J.; Cavalcanti, D.; Pereira, R. C.; Fontes, C. L. F.; Teixeira, V. L.; Paixão, I. C.; The effects of the diterpenes isolated from the Brazilian brown algae *Dictyota pfaffii* and *Dictyota menstrualis* against the herpes simplex type-1 replicative cycle. *Planta Medica* **2010**, *76*, 339. [Crossref][PubMed]
- Cavalcanti, D. N.; de Oliveira, M. A. R.; De-Paula, J. C.; Barbosa, L. S.; Fogel, T.; Pinto, M. A.; Paixão, N. C. I.; Teixeira, V. L.; Variability of a diterpene with potential anti-HIV activity isolated from the Brazilian brown alga *Dictyota menstrualis*. *Journal of applied phycology* **2011**, *23*, 873. [Crossref]
- Garrido, V.; Barros, C.; Melchiades, V. A.; Fonseca, R. R.; Pinheiro, S.; Ocampo, P.; Teixeira, V. L.; Cavalcanti, D. N.; Giongo, V.; Ratcliffe, N. A.; Teixeira, G.; Paixão, I. C. N.; Subchronic toxicity and anti-HSV-1 activity in experimental animal of dolabelladienetriol from the seaweed, *Dictyota pfaffii*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **2017**, *86*, 193. [Crossref][PubMed]
- Cirne-Santos, C. C.; Barros, C. D. S.; Gomes, M. W.; Gomes, R.; Cavalcanti, D. N.; Obando, J. M.; Brito, C. J. R.; Villaça, R. C.; Teixeira, V. L.; Paixão, I. C. D. P.; In vitro antiviral activity against zika virus from a natural product of the Brazilian brown seaweed *Dictyota menstrualis*. *Natural Product Communications* **2019**, *14*, 1. [Crossref]
- Cirne-Santos, C. C.; de Souza Barros, C.; Esteves, P. O.; Gomes, M. W. L.; dos Santos Pereira Gomes, R.; Cavalcanti, D. N.; Obando C. J. M.; Brito, C. J. R.; Villaça, R. C.; Teixeira, V. L. de Palmer Paixão, I. C. N.; Antiviral activity against chikungunya virus of diterpenes from the seaweed *Dictyota menstrualis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2020**, *30*, 709. [Crossref]
- Rubiano-Buitrago, P.; Duque, F.; Puyana, M.; Ramos, F. A.; & Castellanos, L.; Bacterial biofilm inhibitor diterpenes from *Dictyota pinnatifida* collected from the Colombian Caribbean. *Phytochemistry Letters* **2019**, *30*, 74. [Crossref]
- Assef, A. N. B.; da Costa, B. B.; Moreira, T. A.; do Carmo, L. D.; de Souza, T. D. F. G.; Alencar, N. M. N.; Alves, A. P. N.; Cinelli L. P.; Wilke, D. V.; Antitumor and immunostimulating sulfated polysaccharides from brown algae *Dictyota caribaea*. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications* **2021**, *2*, 100142. [Crossref][PubMed]
- Gomes, D. L.; Telles, C. B. S.; Costa, M. S. S. P.; Almeida-Lima, J.; Costa, L. S.; Keesen, T. S. L.; Rocha, H. A. O.; Methanolic extracts from brown seaweeds *Dictyota cilliolata* and *Dictyota menstrualis* induce apoptosis in human cervical adenocarcinoma HeLa cells. *Molecules* **2015**, *20*, 6573. [Crossref][PubMed]
- Weon-Jong, Y.; Young, M. H.; Kil-Nam, K.; Soo-Yeung, P.; Nam, H. L.; Chang-Gu, H.; Wook, J. L.; Anti-inflammatory activity of brown alga *Dictyota dichotoma* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Journal of Medicinal Plants Research* **2009**, *3*, 1. [Link]

19. Albuquerque, I. R. L.; Cordeiro, S. L.; Gomes, D. L.; Dreyfuss, J. L.; Filgueira, L. G. A.; Leite, E. L.; Nader H. B.; Rocha, H. A. O.; Evaluation of anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of a heterofucan from *Dictyota menstrualis*. *Marine Drugs* **2013**, *11*, 2722. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
20. do Nascimento Ávila, F.; da Silva Souza, L. G.; de Macedo Carneiro, P. B.; Santos, F. A.; Sasahara, G. L.; Marinho Filho, J. D. B.; Araújo, A. J.; Barros, A. B.; Monteiro, N. K. V. M.; Silveira, E. R.; Pessoa, O. D. L.; Anti-inflammatory diterpenoids from the Brazilian alga *Dictyota menstrualis*. *Algal Research* **2019**, *44*, 101695. [[Crossref](#)]
21. Durairaj, S. B.; Andiyappan, B. R.; Screening of Phytochemicals, Antibacterial, Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of *Dictyota barteyresiana* Seaweed Extracts. *Asian Journal of Biological and Life Sciences* **2020**, *9*, 21. [[Link](#)]
22. Benfares, R.; Kord, A.; Boudjema, K.; Bouarab, M.; Benrabah, S.; Boudjemaa, K.; Švarc-Gajić, J.; Chemical characterization of essential oils and antioxidant activity of *Dictyota dichotoma* and *Dictyopteris membranacea*. *Acta Periodica Technologica* **2019**, *50*, 33. [[Crossref](#)]
23. Rodrigues, S.; Harb, T. B.; Falcão, E. P. D. S.; Pereira, S. M. B.; Chow, F.; Antioxidant Activity of Dictyotales from Tropical Reefs of Brazil. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2020**, *192*, 665. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
24. Bakar, K.; Mohamad, H.; Tan, H. S.; Latip, J.; Sterols compositions, antibacterial, and antifouling properties from two Malaysian seaweeds: *Dictyota dichotoma* and *Sargassum granuliferum*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science* **2019**, *9*, 47. [[Link](#)]
25. Waghmode, A. V.; Narayankar, C. U.; Patil, M. S.; Nimbalkar, M. S.; Takale, H. V.; Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activity of some common seaweed along west coast of Maharashtra. *Egyptian Journal of Aquatic Biology & Fisheries* **2021**, *25*, 129. [[Crossref](#)]
26. Wu, J.; Xi, Y.; Li, G.; Zheng, Y.; Wang, Z.; Wang, J.; Fang, C.; Sun, Z.; Hu, L. Jiang, W.; Dai, L.; Dong, J.; Qiu, P.; Zhao, M.; Yan, P.; Hydroazulene diterpenes from a *Dictyota* brown alga and their antioxidant and neuroprotective effects against cerebral ischemia-reperfusion injury. *Journal of Natural Products* **2021**, *84*, 1306. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
27. Tariq, A.; Athar, M.; Ara, J.; Sultana, V.; Ehteshamul-Haque, S.; Ahmad, M.; Biochemical evaluation of antioxidant activity and polysaccharides fractions in seaweeds. *Global Journal of Environmental Science and Management* **2015**, *1*, 47. [[Link](#)]
28. Generalić Mekinić, I.; Šimat, V.; Botić, V.; Crnjac, A.; Smoljo, M.; Soldo, B.; Ljubenković, I.; Čagalj, M.; Skroza, D.; Bioactive phenolic metabolites from Adriatic brown algae *Dictyota dichotoma* and *Padina pavonica* (Dictyotaceae). *Foods* **2021**, *10*, 1187. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
29. Machado, L. P.; de Carvalho, L. R.; Young, M. C. M.; Zambotti-Villela, L.; Colepicolo, P.; Andreguetti, D. X.; Yokoya, N. S.; Comparative chemical analysis and antifungal activity of *Ochtodes secundiramea* (Rhodophyta) extracts obtained using different biomass processing methods. *Journal of applied phycology* **2014**, *26*, 2029. [[Crossref](#)]
30. Arumugam, G.; Rajendran, R.; Khaleelullah, N. S.; Ramanathan, S.; Anti-candidal and anti-virulence efficiency of selected seaweeds against azole resistance *Candida albicans*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2019**, *20*, 101195. [[Crossref](#)]
31. Jebakumar Solomon, R. D.; Satheer Santhi, V.; Purification of bioactive natural product against human microbial pathogens from marine seaweed *Dictyota acutiloba* J. Ag. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2008**, *24*, 1747. [[Crossref](#)]
32. Manzo, E.; Ciavatta, M. L.; Bakkas, S.; Villani, G.; Varcamonti, M.; Zanfardino, A.; Gavagnin, M.; Diterpene content of the alga *Dictyota ciliolata* from a Moroccan lagoon. *Phytochemistry Letters* **2009**, *2*, 211. [[Crossref](#)]
33. Castellani, A.; Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **1939**, *42*, 225. [[Link](#)]
34. Ortiz-Ramírez, F. A.; Cavalcanti, D. N.; Villaça, R. C.; de Paula, J. C.; Yoneshigue-Valentin, Y.; Teixeira, V. L.; Chemical variation in the diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota menstrualis* (Dictyotaceae, Phaeophyceae). *Natural Product Communications* **2008**, *13*, 1879. [[Crossref](#)]
35. Obando, J. M. C.; dos Santos, T. C.; Bernardes, M.; Nascimento, N.; Villaça, R. C.; Teixeira, V. L.; Barbarino, E.; Cavalcanti, D. N.; Chemical variation and analysis of diterpenes from seaweed *Dictyota menstrualis* under controlled conditions. *Algal Research* **2022**, *62*, 102637. [[Crossref](#)]
36. Ghallab, D. S.; Shawky, E.; Ghareeb, D. A.; Abdulmalek, S. A.; El-Din, S. M. M.; Mohyeldin, M. M.; Ibrahim, R. S. Exploring the anti-inflammatory bioactive metabolites of some marine algae through integration of metabolomics, network pharmacology and molecular docking analyses. *Food Bioscience* **2022**, *50*, 102091. [[Crossref](#)]
37. Alvarez-Rivera, G.; Ballesteros-Vivas, D.; Parada-Alfonso, F.; Ibañez, E.; Cifuentes, A. Recent applications of high resolution mass spectrometry for the characterization of plant natural products. *Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *112*, 87. [[Crossref](#)]
38. Yuliana, N. D.; Khatib, A.; Choi, J. H.; Verpoorte, R. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. *Phytotherapy Research* **2011**, *25*, 157. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
39. Chang, V. S.; Okechukwu, P. N.; Teo, S. S.; The properties of red seaweed (*Kappaphycus alvarezii*) and its effect on mammary carcinogenesis. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **2017**, *87*, 296. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
40. Layana, P.; Xavier, K. M.; Lekshmi, S.; Deshmukhe, G.; Nayak, B. B.; Balange, A. K.; Antioxidant and antimicrobial potential of hydroethanolic extracts of *Padina tetrastratica* from North-west Coast of India. *Fishery Technology* **2019**, *56*, 199. [[Link](#)]
41. Lee, J. H.; Kim, H. J.; Jee, Y.; Jeon, Y. J.; & Kim, H. J.; Antioxidant potential of *Sargassum horneri* extract against urban particulate matter-induced oxidation. *Food Science and Biotechnology* **2020**, *29*, 855. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
42. Majumder, I.; Paul, S.; Nag, A.; Kundu, R.; Chloroform fraction of *Chaetomorpha brachygona*, a marine green alga from Indian Sundarbans inducing autophagy in cervical cancer cells in vitro. *Scientific reports* **2020**, *10*, 1. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]

43. Yap, W. F.; Tay, V.; Tan, S. H.; Yow, Y. Y.; Chew, J.; Decoding antioxidant and antibacterial potentials of Malaysian green seaweeds: *Caulerpa racemosa* and *Caulerpa lentillifera*. *Antibiotics* **2019**, *8*, 152. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
44. Ramalingam, V.; Kumar, N. N.; Harshavardhan, M.; Kumar, H. M. S.; Tiwari, A. K.; Babu, K. S.; Mudiam, M. K. R.; Chemical profiling of marine seaweed *Halimeda gracilis* using UPLC-ESI-Q-TOF-MSE and evaluation of anticancer activity targeting PI3K/AKT and intrinsic apoptosis signaling pathway. *Food Research International* **2022**, 111394. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
45. Ford, L.; Theodoridou, K.; Sheldrake, G. N.; Walsh, P. J.; A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds. *Phytochemical Analysis* **2019**, *30*, 587. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
46. Martins, A. P.; Yokoya, N. S.; Colepicolo, P.; Biochemical modulation by carbon and nitrogen addition in cultures of *Dictyota menstrualis* (Dictyotales, Phaeophyceae) to generate oil-based bioproducts. *Marine biotechnology* **2016**, *18*, 314. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
47. do Nascimento Ávila, F.; da Silva Souza, L. G.; de Macedo Carneiro, P. B.; Santos, F. A.; Sasahara, G. L.; Marinho Filho, J. D. B.; Araújo, A. J.; Barros A. B.; Monteiro K. V.; Silveira, E. R.; Pessoa, O. D. L.; Anti-inflammatory diterpenoids from the Brazilian alga *Dictyota menstrualis*. *Algal Research* **2019**, *44*, 101695. [[Crossref](#)]
48. Choma, I. M.; Grzelak, E. M. Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A* **2011**, 1218, 2684. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
49. Peres, J. C. F.; Carvalho R. C.; Gonçalves, E.; Berian L. O. S.; Felicio, J. D.. Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts: Avaliação de atividade antifúngica de extratos de macroalgas marinhas. *Ciência e Agrotecnologia* **2012**, *36*, 294. [[Crossref](#)]
50. Kumosani, T. Potential Antioxidant and Anti-Proliferative Activities of Biologically Active Marine Algae Extracts. *Journal of Pharmaceutical Research International* **2017**, *19*, 1. [[Crossref](#)]
51. Kr cisz, M.; Waksmundzka-Hajnos, M.; Oniszcuk, A. Radical scavenging activity of instant gruels enriched with cranberry fruits determined by thin-layer chromatography-DPPH test and by spectrophotometric method. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC* **2017**, *30*, 418. [[Crossref](#)]
52. Lee, Y. S.; Shin, K. H.; Kim, B. K.; & Lee, S.; Anti-Diabetic activities of fucosterol from *Pelvetia siliquosa*. *Archives of pharmacal research* **2004**, *27*, 1120. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
53. Meinita, M. D. N.; Harwanto, D.; Tirtawijaya, G.; Negara, B. F. S. P.; Sohn, J. H.; Kim, J. S.; Choi, J. S.; Fucosterol of marine macroalgae: Bioactivity, safety and toxicity on organism. *Marine Drugs* **2021**, *19*, 545. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
54. Mouritsen, O. G.; Bagatolli, L. A.; Duelund, L.; Garvik, O.; Ipsen, J. H.; Simonsen, A. C.; Effects of seaweed sterols fucosterol and desmosterol on lipid membranes. *Chemistry and physics of lipids* **2017**, *205*, 1. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]