

DOI: <http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20230044>

## 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> (<https://orcid.org/0000-0002-2043-4805>) Johanna M. C. Obando,<sup>b</sup>  
(<https://orcid.org/0000-0001-5351-2219>) Roberto C. C. Martins,<sup>a</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-2325-7912>) Marina A. Alves,<sup>a</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-8188-5554>) Roberto C.  
Villaça,<sup>c</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-7329-3516>) Levi P. Machado,<sup>d</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-6035-851X>) Maria Cândida de G. Gasparoto,<sup>e</sup> (<https://orcid.org/0000-0001-5868-9670>)  
Diana N. Cavalcanti<sup>b,c,\*</sup> (<https://orcid.org/0000-0001-6013-9889>)

<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.

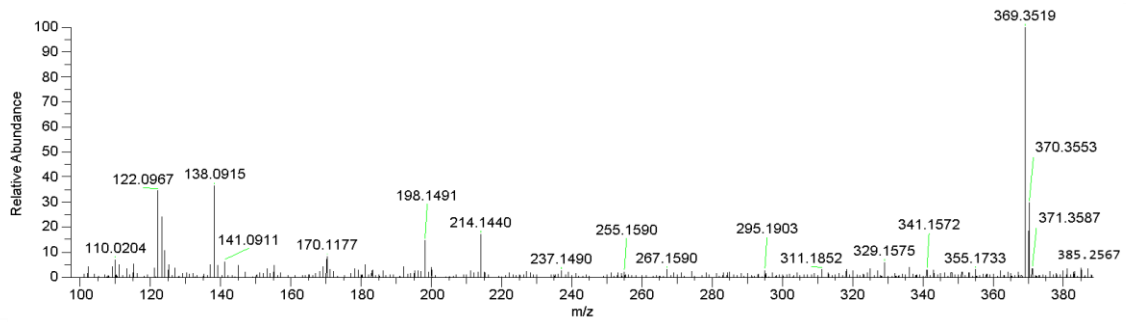
<sup>b</sup> Universidade Federal Fluminense, Instituto de Biologia, Laboratório de Produtos Naturais de Algas Marinhas (ALGAMAR); CEP 24210-130, Niterói-RJ, Brasil.

<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.

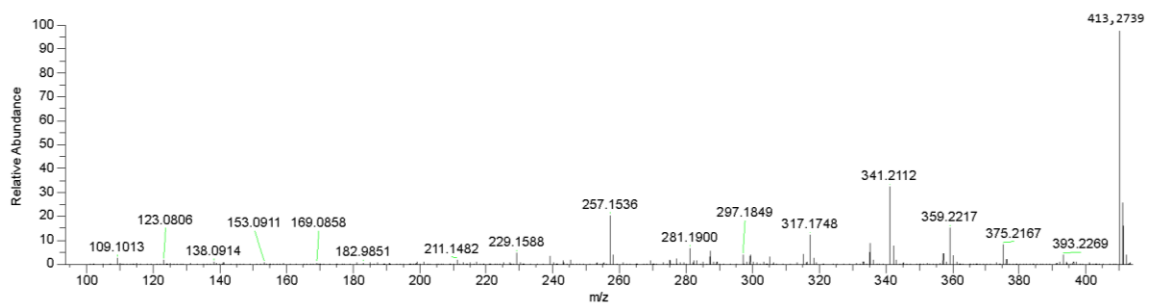
<sup>d</sup> Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Estudos Avançados do Mar (IEAMaR); Departamento de Engenharia de Pesca, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos, CEP 01001-900, São Paulo-SP, Brasil.

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

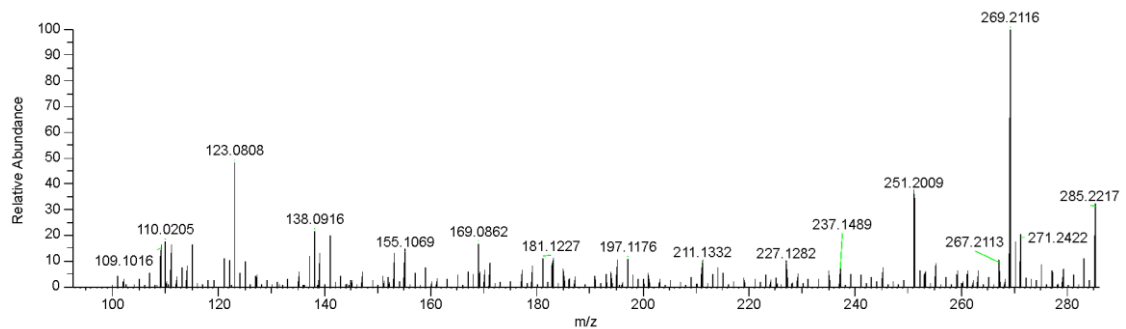
## Informação Suplementar



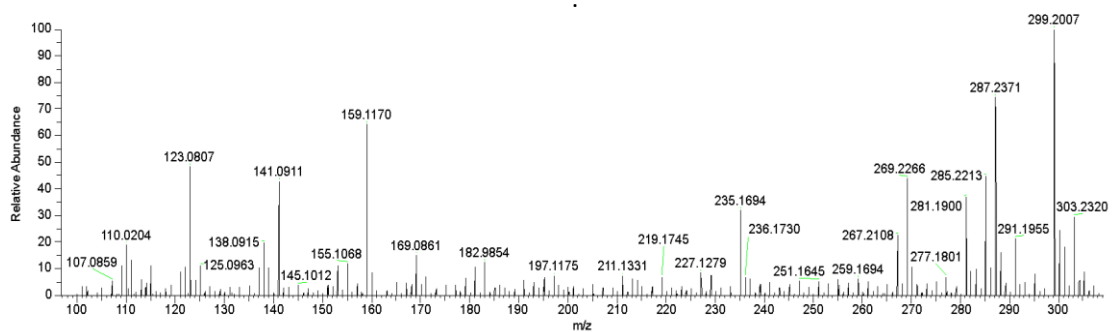
**Figura S1.** Espectro de Massas-Massas do  $m/z$  385,2567 do TR 3,22 min via ionização por eletrospray em modo positivo



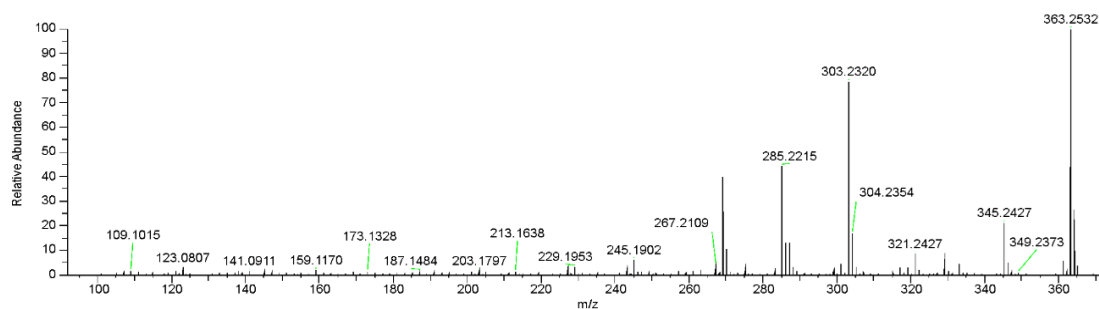
**Figura S2.** Espectro de Massas-Massas do  $m/z$  413,2739 do TR 4,74 min via ionização por eletrospray em modo positivo



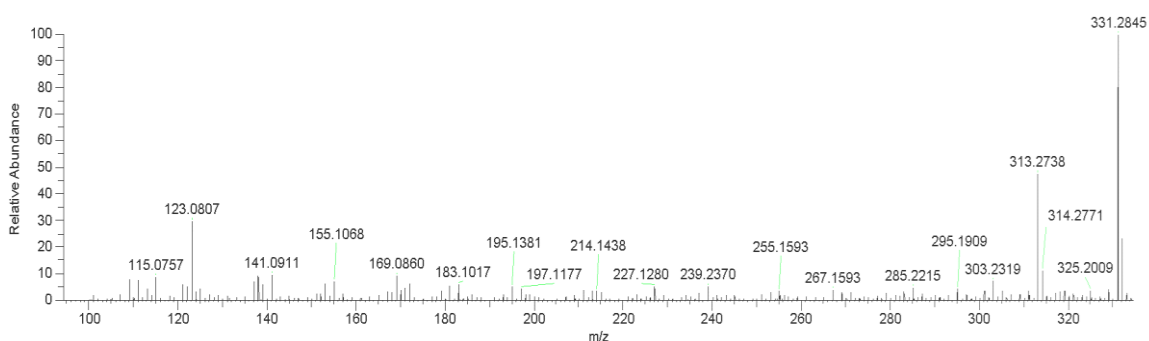
**Figura S3.** Espectro de Massas-Massas do  $m/z$  285,2217 do TR 5,82 min via ionização por eletrospray em modo positivo



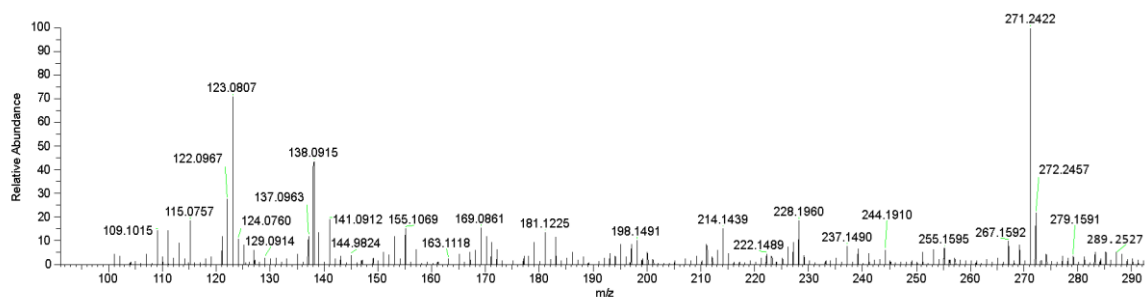
**Figura S4.** Espectro de Massas-Massas do  $m/z$  303,2320 do TR 6,12 min via ionização por eletrospray em modo positivo



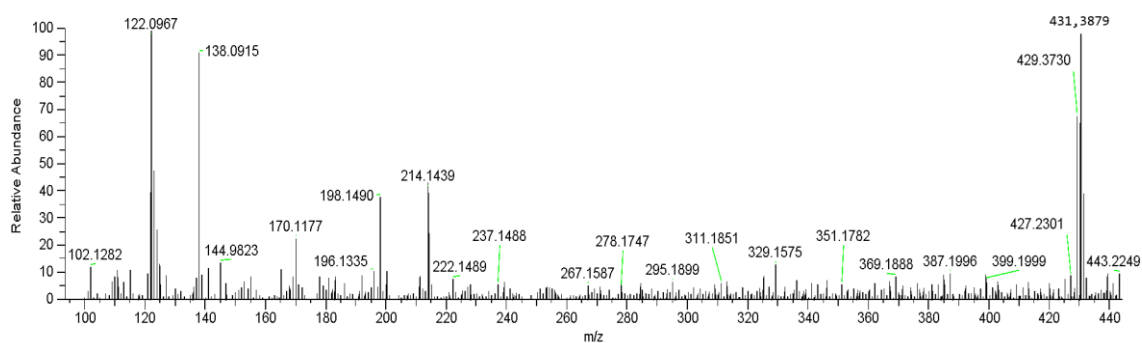
**Figura S5.** Espectro de Massas-Massas do  $m/z$  363,2532 do TR 6,51 min via ionização por eletrospray em modo positivo



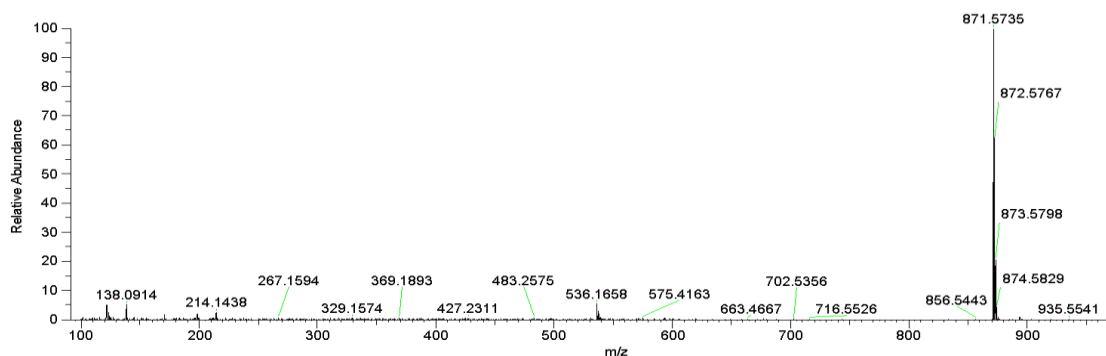
**Figura S6.** Espectro de Massas-Massas do  $m/z$  331,2845 do TR 9,12 min via ionização por eletrospray em modo positivo



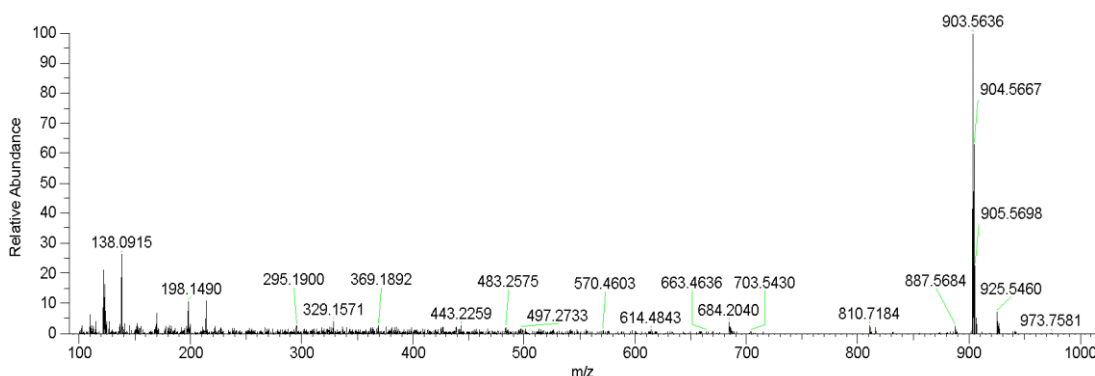
**Figura S7.** Espectro de Massas-Massas do  $m/z$  289,2527 do TR 10,12 min via ionização por eletrospray em modo positivo



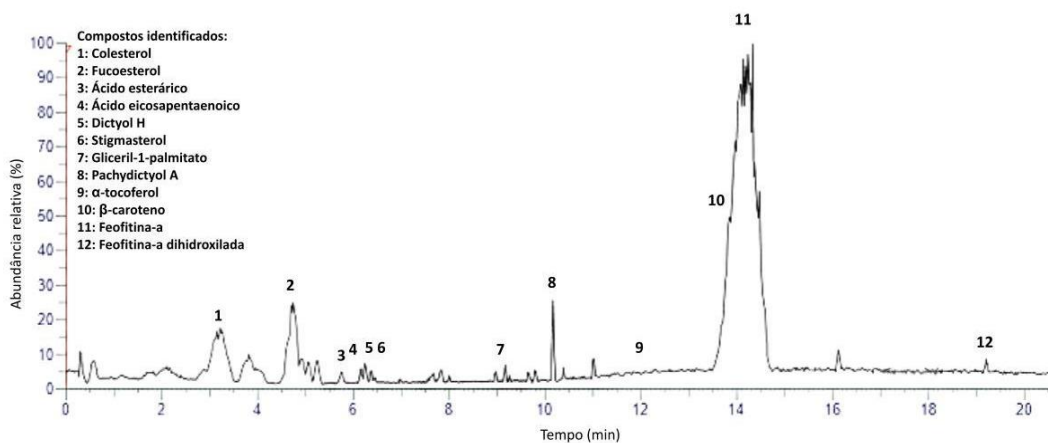
**Figura S8.** Espectro de Massas-Massas do  $m/z$  431,3879 do TR 12,62 min via ionização por eletrospray em modo positivo



**Figura S9.** Espectro de Massas-Massas do  $m/z$  873,5798 do TR 14,22 min via ionização por eletrospray em modo positivo



**Figura S10.** Espectro de Massas-Massas do  $m/z$  903,5636 do TR 19,22 min via ionização por eletrospray em modo positivo



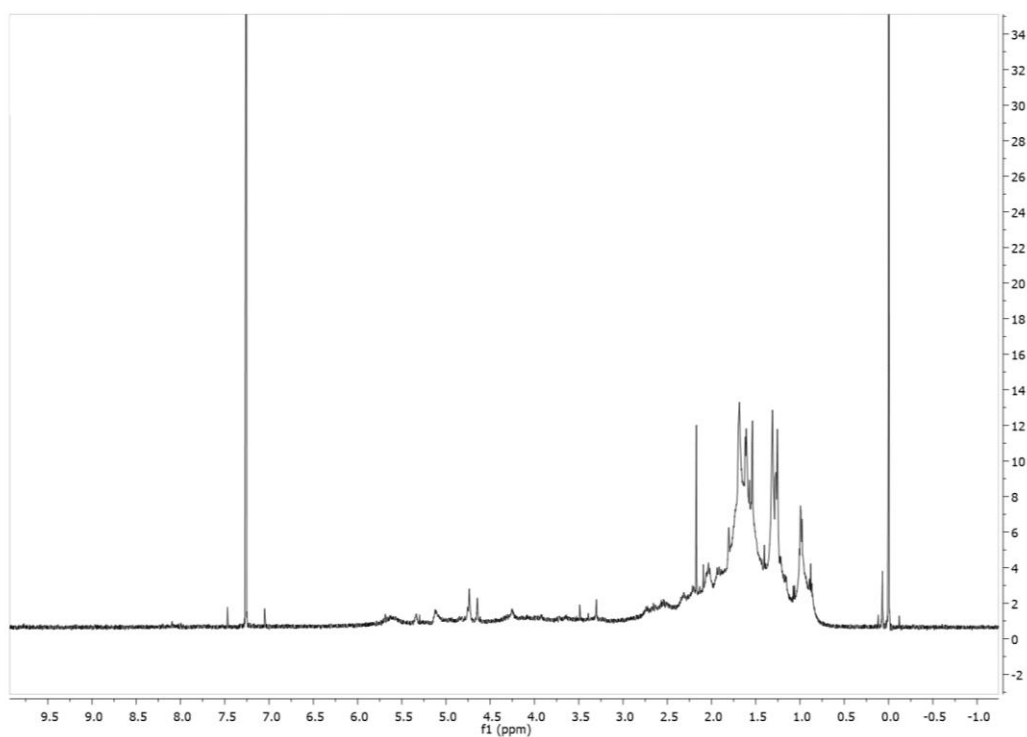
**Figura**

**S11.** Cromatograma de pico base do extrato diclorometânico da macroalga *D. menstrualis* obtido pela técnica CLUE-EMAR (modo positivo)

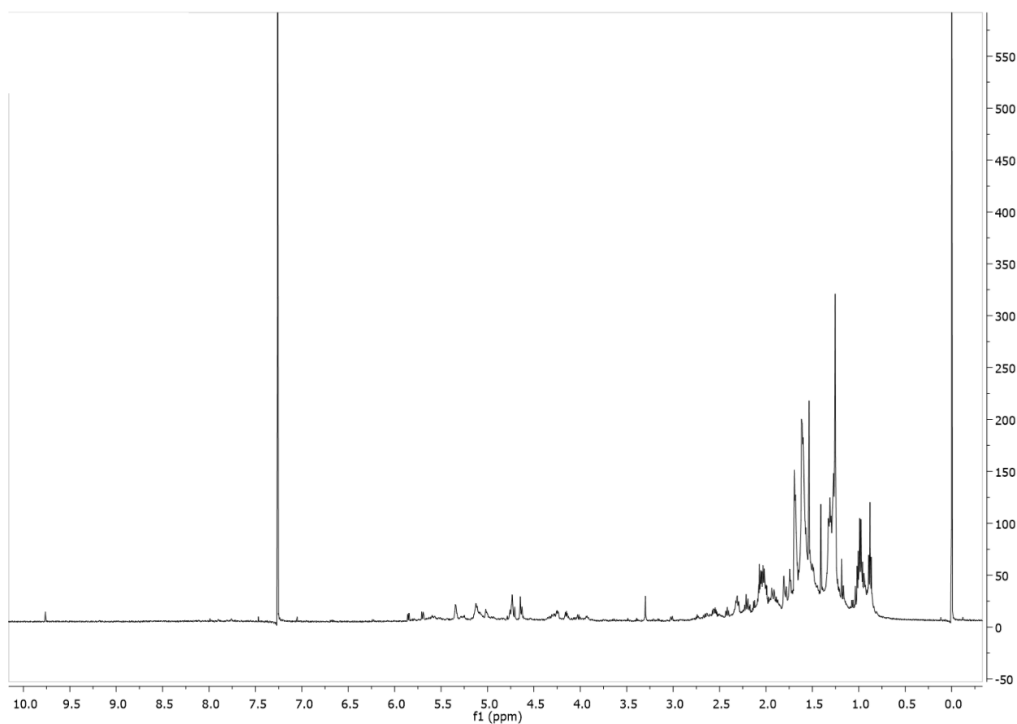
**Tabela S1.** Massas teóricas e experimentais dos íons protonados dos compostos identificados no extrato diclorometânico e frações da macroalga *D. menstrualis* obtidos nos espectros de massas por ionização em eletrospray no modo de ionização positiva. Classe de metabólitos: A: ácido graxo; C: carotenoide; D: diterpeno; E: esterol; G:glicerol-lipídeo; T: tocoferol e P: pigmento fotossintético.

Tempo de retenção (TR)	Identificação	Classe	$m/z$ Teórico [M + H] <sup>+</sup>	$m/z$ Experimental [M + H] <sup>+</sup>	Fórmula molecular	Referência
3,22 min	Colesterol	E	387,3626	387,2567	C <sub>27</sub> H <sub>46</sub> O	1-2
4,74 min	Fucoesterol	E	413,3783	413,2739	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	3-4
5,82 min	Ácido esteárico	A	285,2214	285,2217	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	5

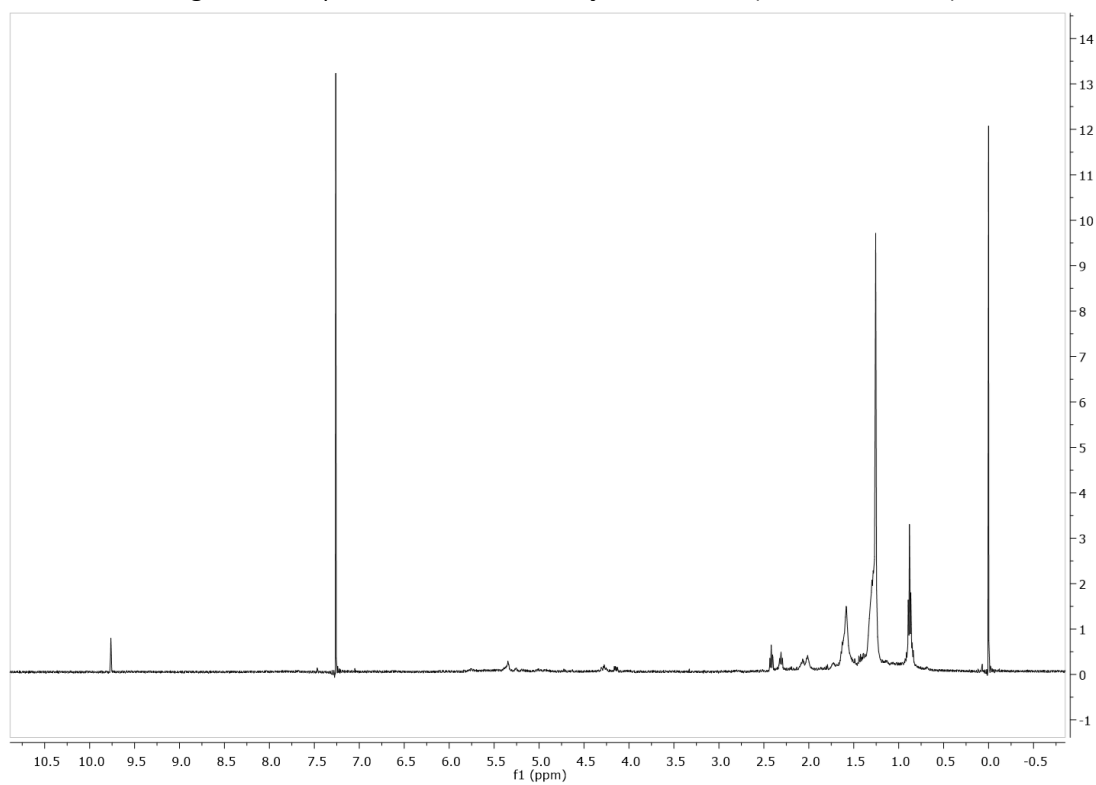
6,12 min	Ácido eicosapentanoico	A	303,2323	303,2322	C <sub>20</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	5
6,50 min	Dictyol H	D	363,2535	363,2532	C <sub>22</sub> H <sub>34</sub> O <sub>4</sub>	6
6,70 min	Estigmasterol	E	413,3783	413,3054	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	7
9,12 min	Glicerol-1-palmitato	G	331,2848	331,2845	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>4</sub>	8
10,12 min	Pachydictyol A	D	289,4828	289,2527	C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> O	9-10
12,62 min	α-tocoferol	T	431,3888	431,3879	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	11
14,02 min	β-caroteno	C	537,4460	537,4382	C <sub>40</sub> H <sub>56</sub>	12-13
14,74 min	Feofitina <i>a</i>	P	871,5737	871,5737	C <sub>55</sub> H <sub>74</sub> O <sub>5</sub> N <sub>4</sub>	14
19,22 min	Feofitina <i>a</i> dihidroxilada	P	903,5636	903,5636	C <sub>55</sub> H <sub>74</sub> O <sub>7</sub> N <sub>4</sub>	14



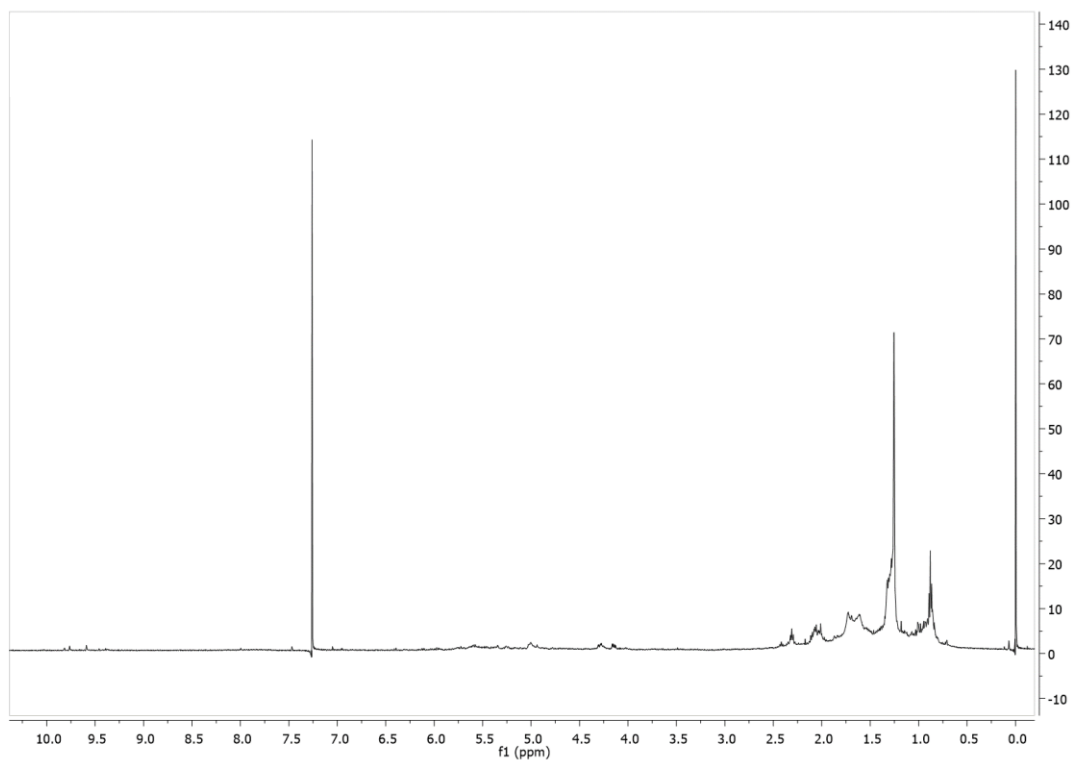
**Figura S12.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H da fração DMPF6-18 (500,0 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



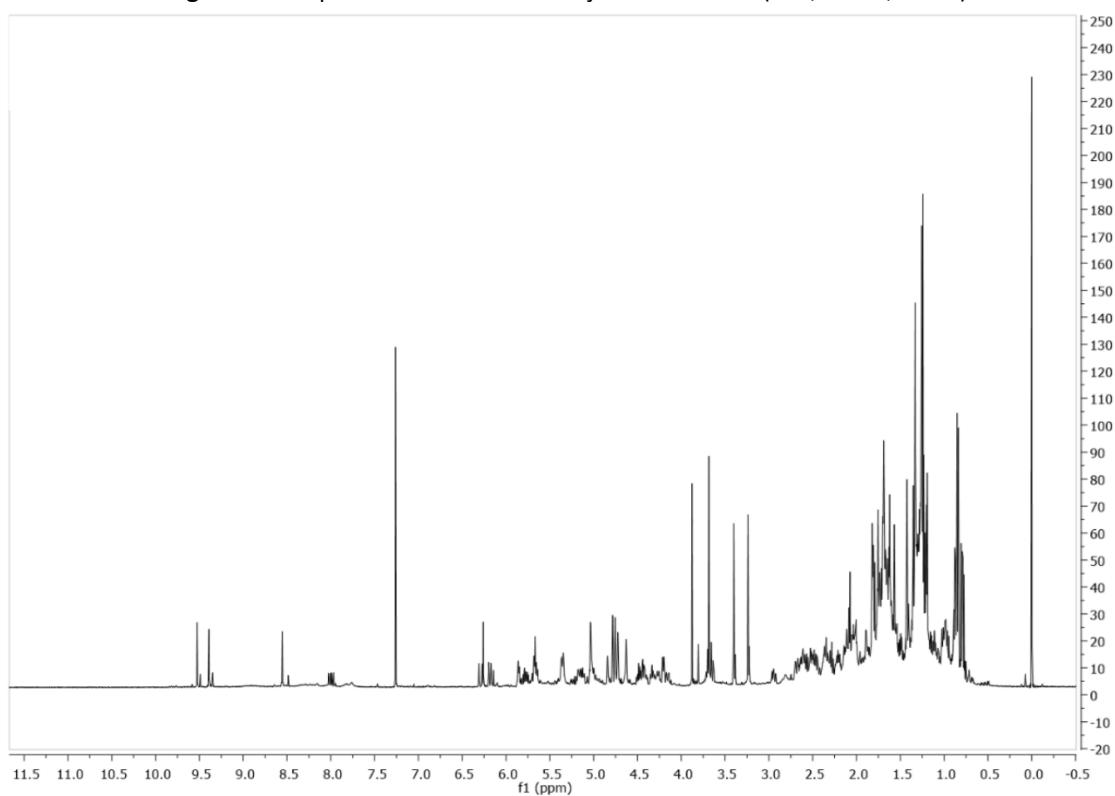
**Figura S13.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H da fração DMC2F4-6 (500,0 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



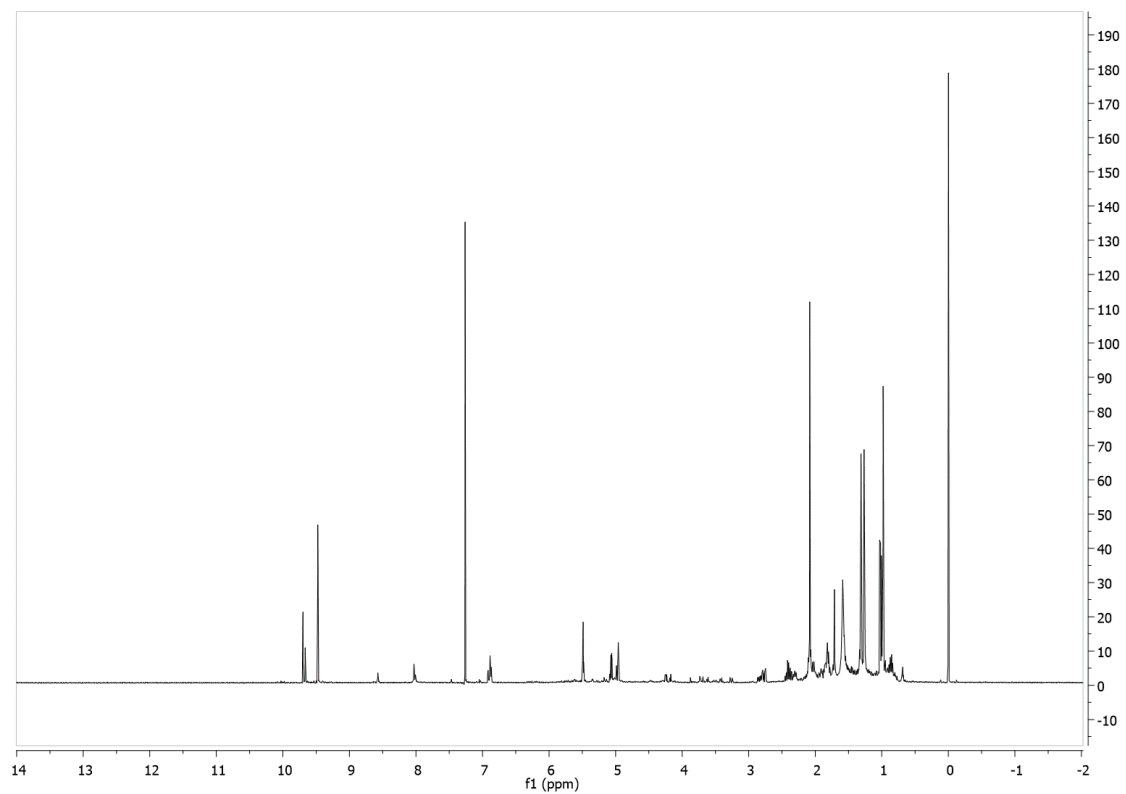
**Figura S14.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H da fração DMC3F1-6 (500,0 MHz, CDCl<sub>3</sub>)



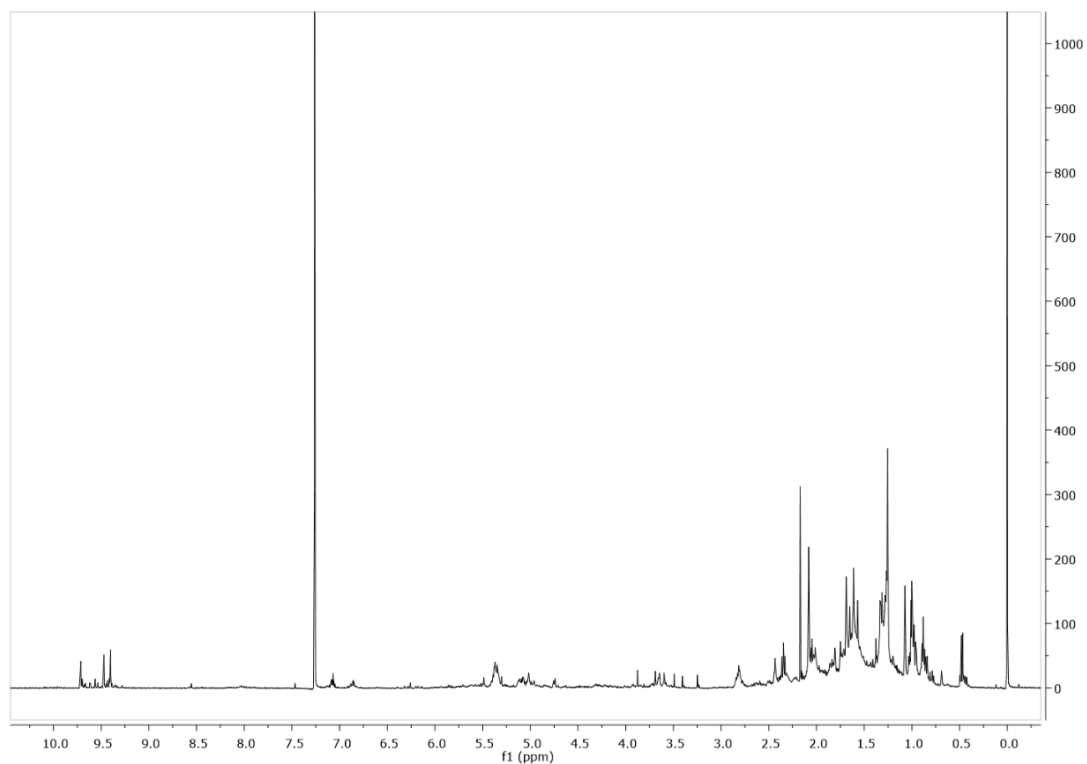
**Figura S15.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração DMC3F8-12 (500,0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura S16.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração DMC3F13-14 (500,0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

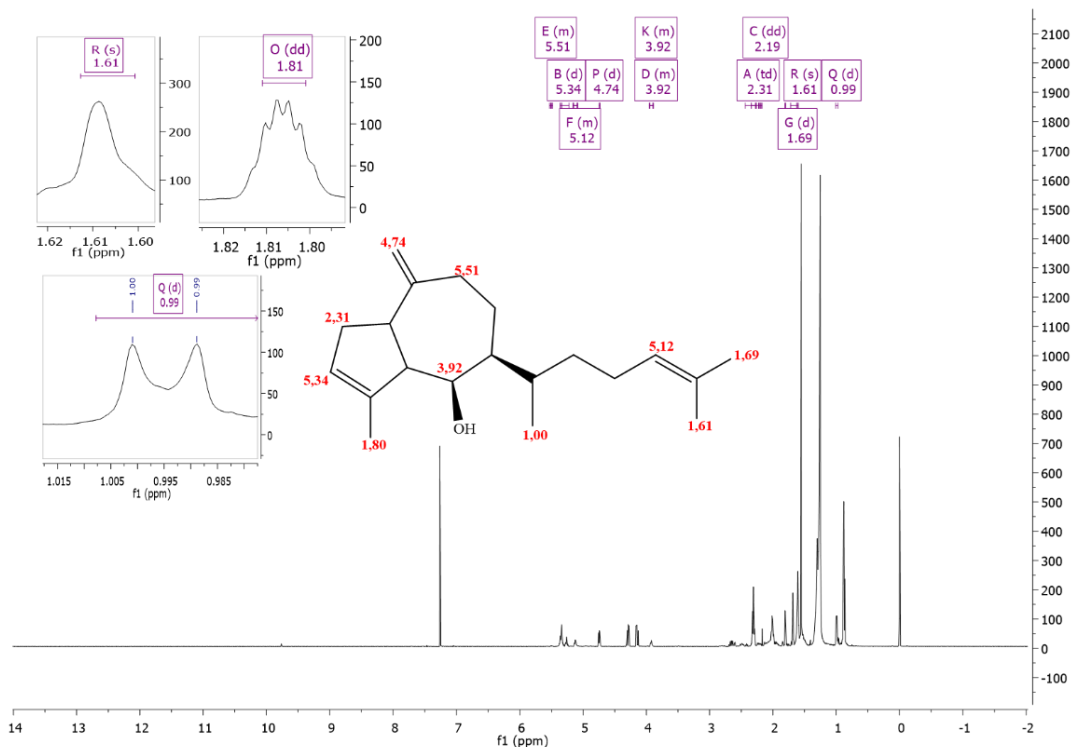


**Figura S17.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da fração DMC3F8-12 (500,0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura S18.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  Do extrato diclorometânico de *Dictyota menstrualis*. (500,0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )



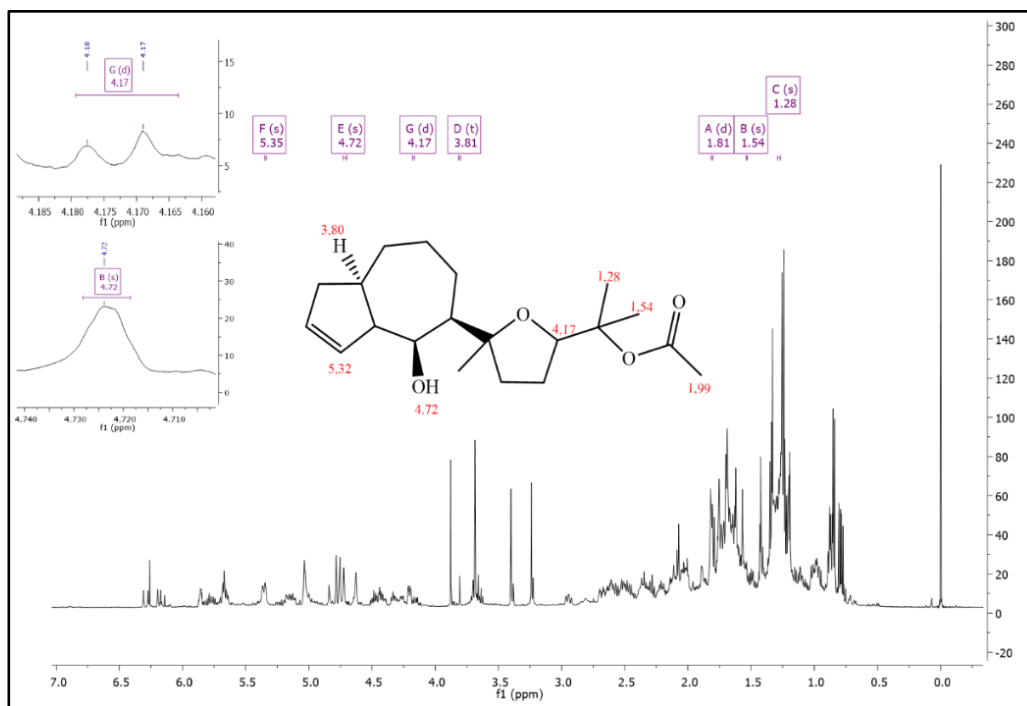


**Figura S19.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500,0 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DMPF6-18 de *D. menstrualis* com sinais correspondentes ao diterpeno Pachydictyol A.

**Tabela S2.** Sinais de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) ao diterpeno pachydictyol A identificados na fração DMPFF6-18 de *D. menstrualis*.

Posição	Pachydictyol A <sup>9</sup> $\delta$ H (n <sup>o</sup> H; m; J Hz) <sup>a</sup>	DMPFF6-18
C <sub>2</sub>	2,31 (2H; m)	+
C <sub>3</sub>	5,34 (1H; d; 1,8)	+
C <sub>5</sub>	2,20 (1H; m)	+
C <sub>6</sub>	3,92 (1H; m)	+
C <sub>9</sub>	5,50 (2H; m)	+
C <sub>14</sub>	5,13 (1H; m)	+
C <sub>16</sub>	1,69 (3H; s)	+
C <sub>17</sub>	1,81 (3H; dd; 2,7 e	+
C <sub>18</sub>	1,2)	+
C <sub>19</sub>	4,74 (2H; d; 1,2)	+
C <sub>20</sub>	1,00 (3H; d; 6,0)	+
	1,61 (3H; s)	

<sup>a</sup> Deslocamento químico/ppm (n<sup>o</sup> H; multiplicidade, constante de acoplamento)



**Figura S20** - Sinais de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) do diterpeno dictyol H identificados na fração DMC3F1-6 obtida de *D. menstrualis*.

**Tabela S3.** Sinais de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz) ao diterpeno dictyol H identificados em frações de *D. menstrualis*. Resultados expressos em termos de ausência (-) e presença (+) de sinais no espectro de RMN  $^1\text{H}$ .

Posição	Dictyol H <sup>6</sup> $\delta$ H ( $n^\circ$ H; m; J Hz) <sup>a</sup>	DMC3F1-6	DMC3F8-12	DMC3F13-14
C <sub>3</sub>	5,35 (1H; s)	-	+	+
C <sub>6</sub>	3,81 (1H; t; 7,1)	-	-	+
C <sub>15</sub>	4,17 (1H; d; 7,0)	-	+	+
C <sub>16</sub>	1,45 (3H; s)	-	+	-
C <sub>17</sub>	1,79 (3H; d; 1,1)	+	-	+
C <sub>18</sub>	4,72 (1H; s)	+	+	+
C <sub>19</sub>	1,28 (3H, s)	+	+	+
C <sub>20</sub>	1,54 (3H, s)	+	+	+
COOCH <sub>3</sub>	1,99 (3H, s)	+	+	+

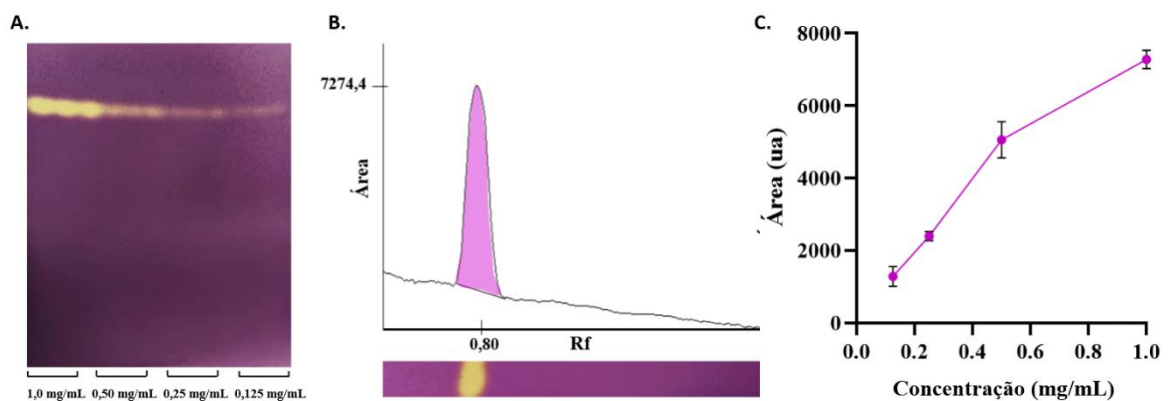
<sup>a</sup> Deslocamento químico/ppm ( $n^\circ$  H; multiplicidade, constante de acoplamento).

### Validação do método CCD-DPPH

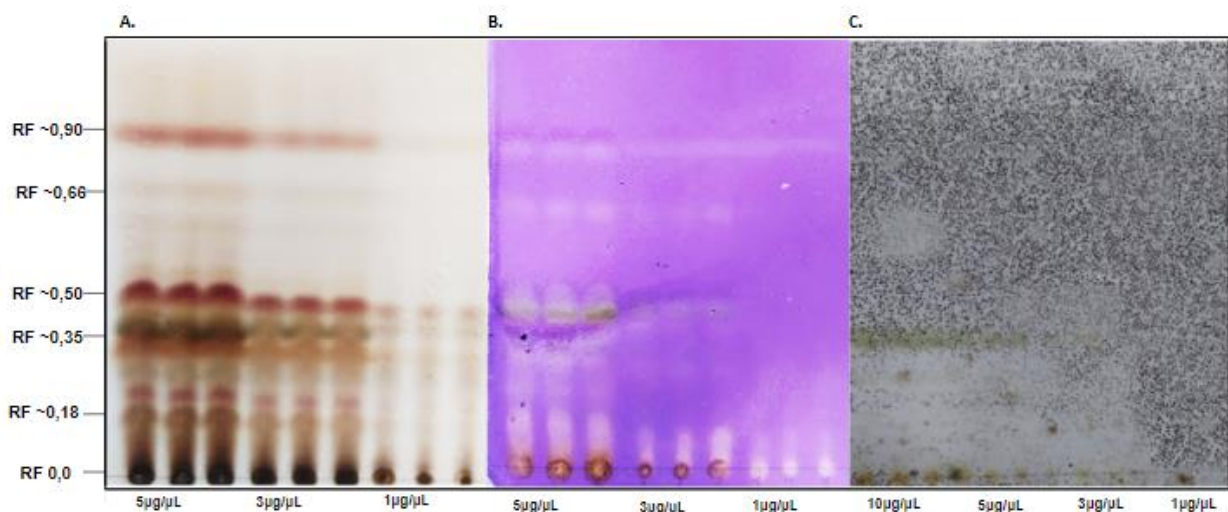
A validação do método foi realizada através de ensaio com o controle positivo  $\alpha$ -tocoferol diluído em diclorometano nas concentrações 1; 0,5; 0,25 e 0,125 mg/mL. A cor amarela/branca desenvolvida contra o fundo roxo da superfície do DPPH indicou a presença de compostos ativos nas amostras. Doravante, as CCDs foram fotografadas e armazenadas como arquivos *Joint Photographics Experts Group* (.jpg) para posterior processamento de imagem. Os arquivos extensão .jpg foram analisados com o software ImageJ elaborado pelo *National Institutes of Health*.<sup>15</sup> Primeiramente, as imagens coloridas

foram convertidas para imagens de intensidade em tons de cinza (8 bits) e aplicado um filtro para eliminação de ruídos (raio 5 pixels). Em seguida, o desvio da linha de base foi removido com o uso de um filtro passa-faixa (grandes estruturas filtradas até 100 pixels; pequenas estruturas filtradas de até 0 pixels).<sup>16</sup>

Os picos cromatográficos foram mostrados como sinais, e a integração de todos os picos foi realizada manualmente. As áreas totais dos cromatogramas de cada amostras em triplicata foram utilizadas para avaliar a atividade antioxidante do controle positivo. Os resultados foram expressos em áreas em que cada valor representa a média de medidas triplicatas  $\pm$  desvio padrão (três medidas de cada amostra).



**Figura S21.** A. Cromatografia em camada delgada (CCD) do controle  $\alpha$ -tocoferol nas concentrações 1,00 mg/mL (1<sup>o</sup>), 0,500 mg/mL (2<sup>o</sup>), 0,250 mg/mL (3<sup>o</sup>) e 0,125 mg/mL (4<sup>o</sup>) eluída no sistema de n-Hexano:Acetato de etila (7:3 v/v) revelada com reagente DPPH. B. Exemplo de cromatograma e integração dos picos do composto  $\alpha$ -tocoferol na concentração de 1,00 mg/mL, obtido através do *software* ImageJ. C. Relação entre área (atividade antioxidante) e concentração do controle  $\alpha$ -tocoferol. Os dados correspondem à média das áreas  $\pm$  desvio padrão



**Figura S22.** Cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato diclorometânico da macroalga *Dictyota menstrualis* nas concentrações 5 mg/mL (1<sup>o</sup>), 3 mg/mL (2<sup>o</sup>), 1 mg/mL (3<sup>o</sup>) eluída no sistema de n-Hexano:Acetato de etila (7:3,

v/v), A. revelada com solução de sulfato cérico (0,2%, p/v) e B. com solução de DPPH (2%, p/v) . C. Bioautografia em CCD revelada com suspensão de esporos de *Cladosporium sphaerospermum* do extrato diclorometânico nas concentrações: 10 mg/mL (1º); 5 mg/mL (2º); 3 mg/mL (3º); 1 mg/mL (4º)

## Referências

1. Van Agthoven, M. A.; Barrow, M. P.; Chiron, L.; Coutouly, M. A.; Kilgour, D.; Wootton, C. A.; Wei, J.; Soulby, A.; Delsuc, M. A.; Rolando, C.; O'Connor, P. B. Differentiating Fragmentation Pathways of Cholesterol by Two-Dimensional Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2015**, *26*, 2105. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
2. Cañabate-Díaz, B.; Segura Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A.; Belmonte Vega, A.; Garrido French, A.; Martínez Vidal, J. L.; Duran Martos, J. Separation and determination of sterols in olive oil by HPLC-MS. *Food Chemistry* **2007**, *102*, 593. [[Crossref](#)]
3. 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](#)]
4. Sánchez-Machado, D. I.; López-Hernández, J.; Paseiro-Losada, P.; López-Cervantes, J. An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomedical Chromatography* **2004**, *18*, 183. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
5. 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](#)]
6. Nunes Pinheiro, A. D.; Pereira Lopes-Filho, E. A.; De-Paula, J. C.; Pereira Netto, A. D.; Teixeira, V. L. Diterpenes from the brown alga *Dictyota mertensii*. *Biochemical Systematics and Ecology* **2019**, *86*, [[Crossref](#)]
7. 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 Applied Pharmaceutical Science* **2019**, *9*, 47. [[Crossref](#)]
8. Ali Khan, I.; Irfan, M.; Villanova, V.; Wang, L.; Hu, L.; ul Qamar, T. M.; Copyright, fnut; ul Qamar, T.; Junaid Rao, M.; Tahir ul Qamar, M.; Wang, D.; Ali, Q.; Ma, L.; Han, S.; Duan, M. A high-throughput lipidomics and transcriptomic approach reveals novel compounds from sugarcane linked with promising therapeutic potential against COVID. *Frontiers in nutrition* **2022**, *9*. [[Crossref](#)]
9. 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*. [[Crossref](#)]
10. Siless, G. E.; García, M.; Pérez, M.; Blustein, G.; Palermo, J. A. Large-scale purification of pachydictyol A from the brown alga *Dictyota dichotoma* obtained from algal wash and evaluation of its antifouling activity against the freshwater mollusk *Limnoperna fortunei*. *Journal of Applied Phycology* **2018**, *30*, 629. [[Crossref](#)]
11. Bogaert, K. A.; Delva, S.; de Clerck, O. Concise review of the genus *Dictyota* J.V. Lamouroux. *Journal of Applied Phycology* **2020**, *32*, 1521. [[Crossref](#)]
12. Bijttebier, S. K. A.; D'Hondt, E.; Hermans, N.; Apers, S.; Voorspoels, S. Unravelling ionization and fragmentation pathways of carotenoids using orbitrap technology: A first step towards identification of unknowns. *Journal of Mass Spectrometry* **2013**, *48*, 740. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
13. Van Breemen, R. B.; Dong, L.; Pajkovic, N. D. Atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry of carotenoids. *International Journal Mass Spectrometry* **2012**, *312*, 163. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]
14. Juin, C.; Bonnet, A.; Nicolau, E.; Bérard, J. B.; Devillers, R.; Thiéry, V.; Cadoret, J. P.; Picot, L. UPLC-MSE profiling of phytoplankton metabolites: Application to the identification of pigments and structural analysis of metabolites in *Porphyridium purpureum*. *Marine Drugs* **2015**, *13*, 2541. [[Crossref](#)][[PubMed](#)]

15. Schneider, C. A.; Rasband, W. S.; Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* **2012**, 9, 671. [[Crossref](#)]
16. Cieśla, Ł. et al. Approach to develop a standardized TLC-DPPH test for assessing free radical scavenging properties of selected phenolic compounds. *Journal Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2012**, 70, 126. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]