



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE**

CRISTIANE MARIA DA CONCEIÇÃO

**ATIVIDADE CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS DE *Dictyota mertensii* (MARTIUS) KUETZING
(HETEROKONTOPHYTA-PHAEOPHYCEAE) DO LITORAL DE PERNAMBUCO**

Vitória de Santo Antão

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

CRISTIANE MARIA DA CONCEIÇÃO

**ATIVIDADE CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS DE *Dictyota mertensii* (MARTIUS) KUETZING
(HETEROKONTOPHYTA-PHAEOPHYCEAE) DO LITORAL DE PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Produtos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva
Falcão

Vitória de Santo Antão

2019

Catálogo na Fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE. Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Lígia F. dos Santos, CRB4/2005

C744a Conceição, Cristiane Maria da.
Atividade citotóxica, genotóxica e mutagênica dos extratos orgânicos de *dictyota mertensii* (martius) kuetzing (*heterokontophyta-phaeophyceae*) do litoral de Pernambuco / Cristiane Maria da Conceição - Vitória de Santo Antão, 2020.

58 folhas; il., tab., graf.

Orientador: Emerson Peter da Silva Falcão.

Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2020.

Inclui referências.

1. Produtos Biológicos. 2. Alga Marinha. 3. Biotecnologia. I. Falcão, Emerson Peter da Silva (Orientador). II. Título.

579.8 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-047/2020

CRISTIANE MARIA DA CONCEIÇÃO

ATIVIDADE CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E MUTAGÊNICA DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS DE *Dictyota mertensii* (MARTIUS) KUETZING
(HETEROKONTOPHYTA-PHAEOPHYCEAE) DO LITORAL DE PERNAMBUCO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente.

Aprovado em: 13/09/2019.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Emerson Peter da Silva Falcão
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Cristiano Aparecido Chagas
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Tamiris Alves Rocha
Secretaria de Educação da Prefeitura de Chã Grande-PE

Prof.^a Dr.^a Simey de Souza Leão Pereira Magnata
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho a Vitor Marques "*in memoriam*", o responsável por me fazer querer começar um mestrado, a Emerson Peter Falcão a razão da conclusão dessa etapa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ter me dado autocontrole.

Agradeço de todo o coração a André Severino da Silva, nunca poderei retribuir a sua dedicação e paciência nesses anos de mestrado, sempre pronto a ajudar e sempre calmo, a sua frase de efeito ecoa nos meus pensamentos perturbados “te acalma menina, vai dá tudo certo”.

A Érima Maria de Amorim, por sua ajuda importantíssima, por todos os dias de “diversão” e estresses, sem sua ajuda não teria dado certo.

As palavras não bastam para agradecer a Dalva Maria da Silva, por sua dedicação e paciência com Miguel, ficando com ele quase dois meses enquanto eu estava no laboratório.

Aos amigos de coração que torceram por mim, para que tudo corresse bem, vocês fazem parte dessa história.

Agradeço ainda aos funcionários da Pós, sempre tão acessíveis e solícitos.

Aos técnicos que colaboraram com meu trabalho.

A Maria de Fátima Oliveira de Carvalho pelos ensinamentos, companheirismo e amizade, sempre a levarei em meus pensamentos.

Aos professores do CAV, que são grandes amigos e psicólogos, sempre prontos a ouvir e ajudar.

Agradeço as pessoas que apareceram nessa jornada e me fizeram querer ser uma pessoa melhor, cada vez mais humana.

Por fim agradeço e dedico este trabalho a razão do meu viver, meu bem maior, Luís Miguel.

RESUMO

Dictyota é um gênero de alga parda, que apresenta metabolitos secundários com atividades biológicas importantes do ponto de vista biotecnológico, nesse contexto esse trabalho teve por objetivo avaliar a ação citotóxica, genotóxica, mutagênica e antioxidante dos extratos etéreo, clorofórmico e acetônico, de *Dictyota mertensii* coletada em três praias do litoral de Pernambuco, Cupe, Itapuama e Pontas de Pedras. A análise com CG apresentou um padrão distinto de picos, para os três extratos analisados. A praia do Cupe mostrou um padrão mais complexo com 22 picos em relação a Itapuama que apresentou sete picos, já Pontas de Pedra apresentou apenas três picos. A análise do padrão de fragmentação dos espectros de massas dos compostos levou a identificação do fenol,4,6-di(1,1-dimetil-etil)-2-metil, sendo este o produto comum as três amostras, e também o produto majoritário no extrato etéreo de Pontas de Pedras. Para o teste citotóxico, por apresentar um melhor rendimento, foi utilizado o extrato etéreo das três praias em linhagens de células tumorais humanas, NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano), HCT-116 (adenocarcinoma colorretal humano) e MCF-7 (câncer de mama humano). O ensaio cometa foi escolhido para verificar-se a eventual ação genotóxica, foram utilizadas larvas de *Drosophila melanogaster*, linhagem Oregon-R. As larvas foram expostas por 24 horas ao extrato etéreo, nas concentrações 0,64, 1,28, 2,56, 5,12 e 10,24 mg/mL, e aos solventes Etanol e Tween 80 (grupo controle negativo). O teste SMART foi o escolhido para se avaliar eventual atividade mutagênica. Sendo utilizadas linhagens de *flr* e *mwh* de *D. melanogaster*. As larvas foram expostas aos extratos nas concentrações acima descritas, a toxicidade foi avaliada e construída uma curva de sobrevivência para os extratos avaliados. As manchas e pelos mutantes das asas dos indivíduos adultos tratados foram analisadas em microscópio óptico e comparados aos resultados do grupo controle negativo. A atividade antioxidante pelo ensaio do 2,2- difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) avaliou a ação dos três extratos das três praias, usando ácido gálico, quercetina e hidroxitolueno butilado (BHT). Os extratos de Cupe e Ponta de pedras apresentaram ação citotóxica estatisticamente significativa, a concentração de 50µg/mL. Sendo observadas inibições de 91% na linhagem NCI e 100% nas linhagens HCT e MCF e de 100% em HCT e 68,7% frente a MFC, respectivamente para as duas praias, Itapuama não apresentou resultado estatisticamente significativo. O teste Genotóxico

mostrou que em 80% dos nucleóides o dano foi classificado como zero, numa escala que vai de 0 a 4. Quando comparado ao controle negativo, o composto apresentou danos menores. De modo que os extratos etéreos de ambas as praias não apresentam efeito genotóxico, dentro dos parâmetros experimentais usados. Os resultados dos ensaios antioxidantes mostraram, para os quatro extratos avaliados, ação superior ao ácido gálico, quercetina e BHT, com destaque para o extrato etéreo de Pontas de Pedras, que apresentou 118% de atividade e Cupe com 85%, Itapuama teve média de 73% de captura de radicais livres nos três extratos

Palavras-Chave: Dictyotaceae. Atividades Biológicas. Produtos Naturais.

ABSTRACT

Dictyota is a genus of brown algae that has secondary metabolites with important biological activities from a biotechnological point of view. In this context, this work aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic, mutagenic and antioxidant action of etheric, chloroform and acetic extracts of *Dictyota mertensii*, collected on three beaches of the coast of Pernambuco, Cupe, Itapuama and Pontas de Pedras. GC analysis showed a distinct peak pattern for the three extracts analyzed. Cupe beach showed a more complex pattern with 22 peaks compared to Itapuama which had seven peaks, while Pontas de Pedra had only three peaks. Analysis of the fragmentation pattern of the mass spectra of the compounds led to the identification of phenol, 4,6-di (1,1-dimethylethyl) -2-methyl, the common product being the three samples, and also the major product in the ethereal extract of Pontas de Pedras. For better cytotoxic testing, ether extract from the three beaches in human tumor cell lines NCI-H292 (human lung mucoid carcinoma), HCT-116 (human colorectal adenocarcinoma) and MCF-7 (human breast cancer). The comet assay was chosen to verify the possible genotoxic action. *Drosophila melanogaster* larvae, Oregon-R strain, were used. Larvae were exposed for 24 hours to ether extract at concentrations 0.64, 1.28, 2.56, 5.12 and 10.24 mg / mL, and to solvents Ethanol and Tween 80 (negative control group). The SMART test was chosen to evaluate eventual mutagenic activity. Using *D. melanogaster* flr and mwh strains. Larvae were exposed to extracts at the concentrations described above, toxicity was evaluated and a survival curve was constructed for the evaluated extracts. The spots and wing mutants of the treated adult individuals were analyzed by light microscopy and compared to the results of the negative control group. Cupe and Ponta de Pedra extracts showed a statistically significant cytotoxic action at a concentration of 50 µg / mL. With inhibitions of 91% in NCI and 100% in HCT and MCF and 100% in HCT and 68.7% against MFC, respectively for both beaches, Itapuama did not present statistically significant results. The results of the genotoxic test showed 80% of nucleosides with zero damage on a scale ranging from 0 to 4. When compared to the negative control the data show an even lower effect. Therefore, the ethereal extracts of both beaches do not have genotoxic effect, within the experimental parameters used. The results of the antioxidant tests showed, for the four extracts evaluated, superior action to gallic acid, quercetin and BHT, especially the ethereal extract of

Pontas de Pedras, which presented 118% of activity and Cupe with 85%. Itapuama had an average of 73% free radical capture in all three extracts.

Keywords: Dictyotaceae. Biological Activities. Natural Product.

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	Acetato de Etila
ANOVA	Análise de Variância (Do inglês “Analysis of Variance ”)
BHA	buthylated hydroxyanisole
BHT	Hidroxitolueno butilado
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-MS	Cromatografia gasosa com espectrômetro de massa
CVB3	Coxsackievirus B3
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
FD	Frequencia de Dano
<i>flr³</i>	Flare
HCT 116	Carcinoma do cólon humano
HeLa	Câncer cervical (Henrietta Lacks)
HPV 16	Câncer de colo uterino
ID	Índice de Dano
MCF-7	Cancer de mama humano
MS	Espectrômetro de massa
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<i>Mwh</i>	multiple wing hairs
NCI-H 292	Carcinoma pulmonar mucoepidermóide
SMART	Teste de mutação e recombinação somática

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1 Macroalgas.....	15
3.2 Atividade Citotóxica	18
3.3 O Modelo Drosophila	19
3.4 Antioxidante.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Coleta e Identificação da Alga.....	22
4.3 Obtenção dos Extratos Orgânicos	22
4.4 Cromatografia em Camada Delgada.....	23
4.5 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG - MS) ...	23
4.6 Avaliação da Atividade Citotóxica	24
4.7 Ensaio Cometa	25
4.8 Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART).....	27
4.9 Teste Antioxidante – DPPH	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1 Rendimento dos Extratos	29
5.2 Cromatografia em Camada Delgada.....	30
5.3 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas .	31
5.4 Avaliação Citotóxica	35
5.5 Avaliação da genotoxicidade	37
5.6 Avaliação Da Mutagenicidade	41
5.7 Atividade Antioxidante.....	42
6 CONCLUSÕES	45
REFERENCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

Dictyota mertensii (C. Martius) Kützing é uma macroalga marinha parda, pertencente à ordem *Dictyociales*, grupo que apresenta uma expressiva produção de fenóis e terpenos os quais até a década de 80 eram usados apenas como marcadores taxonômicos (TEIXEIRA; TOMOSSINI; KELECOM, 2010). O avanço na área de biotecnologia a partir do isolamento químico de metabolitos secundários tem mostrado o grande potencial farmacológico das algas pardas (PINTO *et al.*, 2002). Comprovar a eficácia dos produtos químicos isolados de *D. mertensii* tem sido objeto de pesquisa de diversos grupos de estudos, evidenciando os efeitos positivos, tanto de extratos orgânicos como de compostos isolados, em testes de atividades antitumorais, antifúngicos e antibacterianos, entre outros, (PINHEIRO-VIEIRA; CALAND-NORONHA, 1971).

O grupo *Dictyota* vem se tornando uma fonte renovável de biomaterial para pesquisa de novos fármacos, com ampla aplicabilidade como: antinociceptiva (VANDERLEI, 2008), antioxidante (GRESSLER, 2010), anti-inflamatória (MATTA, 2011), antifúngica (STEIN, 2011), antibacteriana (NASCIMENTO, 2015) e leishmanicida (CLEMENTINO, 2017).

Para comprovar a eficácia ou toxicidade de tais compostos, se faz necessário a realização de experimentos, entre estes se destaca o ensaio citotóxico, (MAGWOOD, 1996), que se tornou muito utilizado devido a obtenção de resultados rápidos e a grande variedade de organismos modelo que podem ser utilizados, entre eles: *Allium cepa* (SANTOS; SANTOS; MARISCO, 2017), Camundongos (SAMPAIO, 2017), células tumorais (BARROS *et al.*, 2018), *Drosophila melanogaster* (COELHO, 2016) entre outros.

Na perspectiva da avaliação citotóxica, a cultura de células tumorais apresenta vantagens por poder limitar o número de variáveis experimentais, obter dados significativos, tudo isso quando se compara as metodologias *in vitro* e *in vivo* (ROGERO *et al.*, 2003), além de poupar o uso de animais. As células tumorais adquiridas a partir de pacientes com câncer são mantidas em meio de cultura adequado até serem utilizadas (ROGERO *et al.*, 2003).

Não obstante a relevância da prospecção por novos fármacos utilizando-se as algas é igualmente relevante o estudo de seus efeitos tóxicos incluindo-se a

importância em se averiguar seus possíveis danos ao DNA. Para identificar tais danos podem ser realizadas análises de micronúcleos em células de camundongos, ou ainda o Ensaio Cometa, com células da hemolinfa de *D. melanogaster*. (LIMA, 2009; AMORIM, 2016).

Somado a essas alternativas o Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) que também utiliza grupos de *Drosophila*, pode elucidar o grau de mutação causados ao DNA, através da exposição direta dos organismos ao material de interesse. A prole da geração exposta vai apresentar as alterações sofridas através de modificações nos pelos existentes nas suas asas (ROBERTS, 2006).

A molécula de DNA também pode sofrer danos por ação de radicais livres, os quais ocasionam diversas doenças, desde o envelhecimento precoce, ao surgimento de tumores, achar um produto que tenha uma atividade antioxidante é de grande interesse para indústrias farmacêuticas. Uma técnica usada para avaliar a capacidade antioxidante é o 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) que tem habilidade de sequestrar o radical estável e do β -caroteno/ácido linoleico o qual inibe a oxidação (ARAÚJO, 2018; DUARTE-ALMEIDA, 2006).

A macroalga *Dictyota mertensii* (MARTIUS) Kuetzing, 1859 (Heterokontophyta-Phaeophyceae), do litoral de Pernambuco, e relativamente pouco estudada. Estudos relativos à sua composição química são escassos, entretanto sabe-se que contém compostos aromáticos, terpenos, diterpenos, polissacarídeos sulfatados como as fulcanas (TEXEIRA, 2007).

Portanto, este trabalho tem o intuito de explorar o potencial citotóxico, genotóxico, mutagênico e antioxidante dos extratos orgânicos da macroalga *Dictyota mertensii* (MARTIUS) Kuetzing, 1859 (Heterokontophyta-Phaeophyceae), do litoral de Pernambuco.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Testar o potencial citotóxico, antioxidante *in vitro*; genotóxico e mutagênico *in vivo* de extratos orgânicos *Dictyota mertensii* (Ochrophyta-Phaeophyceae) em diferentes praias do litoral de Pernambuco.

2.2 Objetivos específicos

- Obter os extratos orgânicos etéreo, clorofórmico, acetônico e aquoso da *Dictyota mertensii*;
- Averiguar qual praia os extratos de *D. mertensii* apresenta um melhor rendimento de extratos orgânicos;
- Avaliar a composição de metabólitos secundários a partir do extrato etéreo, clorofórmico, acetônico e aquoso, de *D. mertensii* através de técnicas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia gasosa;
- Avaliar a ação citotóxica *in vitro* dos extratos algais frente às células tumorais HCT 116, MCF-7 e NCI-H 292;
- Avaliar o potencial genotóxico dos metabólitos secundários algais, em células da hemolinfa de larvas da linhagem *Oregon-R* de *D. melanogaster*, utilizando a técnica de análise do dano celular através do Ensaio Cometa;
- Caracterizar qualitativa e quantitativamente o potencial mutagênico, dos extratos orgânicos da *Dictyota mertensii* em células somáticas de *Drosophila melanogaster*, através da aplicação do teste SMART;
- Averiguar a ação antioxidante dos extratos etéreo, clorofórmico, acetônico e aquoso.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Macroalgas

Dentre o grupo das macroalgas, a Ochrophyta atingiu o maior grau de complexidade morfológica e estrutural, podendo ocorrer como epífitas ou fixas a rochas (PEDRINE, 2013). São bentônicas e se encontram fixas à costões rochosos nas regiões entremarés, por essa razão competem por espaço para fixação e produzem substâncias para sua proteção contra ataques de herbívoros (DE ALMEIDA, 2008).

Apresentam um perfil químico muito importante e variado de acordo com o tipo de stress sofrido. Faulkner (2001) fez um levantamento bibliográfico sobre os diversos metabólitos secundários presentes na família Dictyocetaceae, os quais protegem esses organismos do estresse causado pela baixa da maré e predação. Devido a essa vantagem de proteção contra fatores ambientais, nos últimos anos, estudos que avaliam o potencial biotecnológico desse grupo vêm crescendo.

São reconhecidos cerca de 20 gêneros dentre eles o *Dictyota* J. V. Lamouroux, 1809, (GUIRY; GUIRY, 2019), o mais descrito na produção de metabólitos secundários de relevância biotecnológica, citando-se: ácidos graxos, terpenos e esteróis (PITOMBO *et al.*, 1989; FLEURY *et al.*, 1996; VALLIM *et al.*, 2005).

Estudos a partir de extratos brutos, obtidos de talos secos ou frescos são realizados com finalidade de descrever os componentes químicos e as rotas biossintéticas de *D.mertensii* (PHLIPPUS, 2016; FERNANDES, 2018). Evans e Holligan (1972) detectou através de microscopia óptica, que os talos de *D. dichotoma* apresentam três a quatro camadas bem definidas, de ácido algínico, polissacarídeo sulfatado ou uma mistura dessas substâncias, oferecendo mais uma perspectiva para identificação ou isolamento de substâncias.

Descritos por Durán *et al.*, (1997), dois novos diterpenos para *D. dichotoma*, isopachydictyol A e dictyotatriol A, apresentam atividade citotóxica frente as células tumorais. Outros trabalhos que descrevem os elementos bioativos mostram a eficácia dos extratos algais, em testes que avaliam a ação, larvicida (SCHMITT, 1998; BEULA, 2011), atividade antiviral HIV, HSV-1, CVB3 (PEREIRA *et al.*, 2004;

RABANAL, 2014; STEPHENS *et al.*, 2017), Antibacteriano (SINGH, 2014; ÁGUILA-RAMÍREZ *et al.*, 2017), Antitumoral (GOMES *et al.*, 2015; USOLTSEVA *et al.*, 2017).

Dictyota mertensii (Figura 1) também vem se destacando ao longo dos anos com trabalhos realizados acerca de suas propriedades biossintéticas, tais como: antiherbivoria (PEREIRA, 2009; FREITAS, 2006), anticoagulante (CÂMARA, 2010), antioxidante (CÂMARA, 2010, BARACHO *et al.*, 2017), antimicrobiano (BORBÓN *et al.*, 2012; NEGREIROS, 2015), antileishmania (ALIANÇA *et al.*, 2014), atividade Antiviral (BEZERRA, 2016).

Apresenta morfologia com talo de coloração parda, medindo até 20 cm de altura, ramificado dicotomicamente, apresentando as últimas ramificações alternas (PEDRINI, 2013). Ocorre em ambientes moderadamente protegidos do embate das ondas, tanto no *meso* quanto no infralitoral, até 25m de profundidade (NUNES, 1999; CRISPINO, 2000).

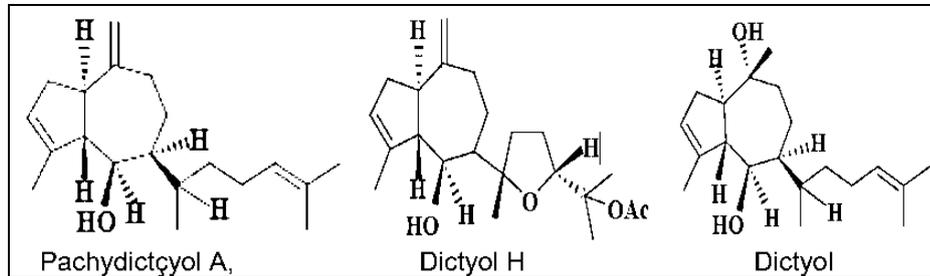
Figura 1 - *Dictyota mertensii*



Fonte: A autora.

Essa espécie é caracterizada pela produção de dictióis (guaiananos prenilados - Grupo I), (ALARADO; GERWICK 1985; KELECOM *et al.*, 1991), tendo sido isolados o pachydictyol A, que apresenta citotoxicidade moderada (CAAMAL-FUENTES, 2014), potente atividade antitrombótica (SIMAS, 2014), fator antiangiogênico contra neovascularização retiniana (SUBRAMANIAN, 2018). O dictyol H e dictyol C (figura 2) apresentam atividades inibitórias contra a oncoproteína E6 viral do HPV16 (DHAMODHARAN, 2018), antitumoral (MICHALAK *et al.*, 2015).

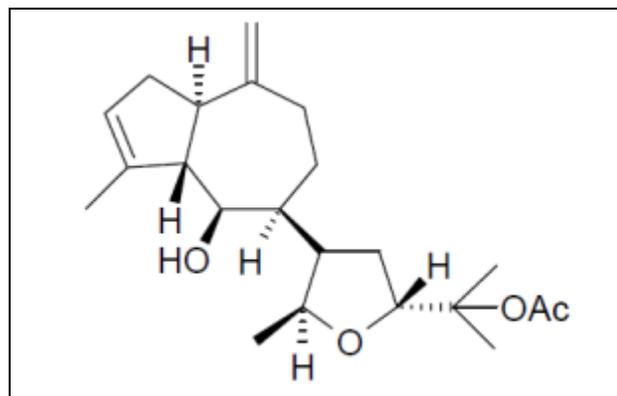
Figura 2 - Estrutura química dos dictióis encontrados em *D. mertensii*



Fonte: VALLIM,2004.

Os diterpenos (Figura 3) também são metabolitos de grande importância em *D.mertensii*, sendo em muitos casos o produto majoritário (VALLIM, 2007), servem como identificador taxonômico, e apresentam diversas atividades de interesse farmacológico como descrito anteriormente. Esses compostos químicos apresentam uma rota química similar para alguns membros do gênero *Dictyota* (ARAUJO, 2014).

Figura 3 - Estrutura do principal diterpeno encontrado na fração ativa obtida do extrato bruto de *D. mertensii*.



Fonte: VALLIM, 2007.

D. mertensii apresenta variações quantitativas e qualitativas, quanto ao rendimento total do extrato bruto, composição química, e efeitos bioativos, essa variação pode se dar por diversos fatores, desde o nível de predação, localização geográfica e profundidade onde o organismo encontra-se (FREITAS, 2006). influenciando nos resultados de testes realizados com extrato bruto ou com compostos isolados.

3.2 Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica é bastante utilizada na área da biotecnologia, um dos modelos comumente utilizados são as células tumorais. Este modelo permite se utilizar uma estratégia de investigação e avaliação *in vitro* da atividade citotóxica e/ou antineoplásica de produtos naturais. Um dos métodos utilizados é baseado em ensaios colorimétricos, que quantifica a proliferação de culturas de células, em placas de microtitulação, empregando um leitor de ELISA que avalia a quantidade de células vivas por uma cor característica. Posteriormente a metodologia passou a realizar leituras das placas em espectrofotômetro, que mostra resultados ainda mais confiáveis (DENIZOT; LANG, 1986; MOSMANN 1983; ROGERO, 2003).

As células tumorais têm se mostrado nos últimos anos um modelo de pesquisa muito utilizado, pelo fato de poder ser utilizadas em análises de citotoxicidade, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, mostrando resultados em curto espaço de tempo. As células são isoladas a partir de pacientes que apresentam algum tipo de doença tumoral, a primeira e mais famosa célula tumoral isolada foi a HeLa, a partir de 1950 (CALDAS, 2010; HUECK, 2016; MAES, 2016).

O sucesso na manutenção das células tumorais HeLa foi um advento para a prática da cultura celular, pois possibilitou o desenvolvimento de vários tipos de descobertas, como por exemplo a vacina para poliomielite (SCHERER; SYVERTON; GEY, 1953). Esse tipo de célula possui uma característica importante que é a de se replicar com facilidade, essa alta replicação é característica dos tumores, principalmente os metastáticos, por sofrerem mutações que as favorecem (ALBERTS *et al.*, 2010).

Os tumores metastáticos ou câncer como é popularmente conhecido, é hoje um grave problema de saúde mundial, sendo uma das principais causas de morte, apesar de existir tratamento para essa enfermidade, que incluem principalmente quimioterapia e radioterapia, além de cirurgia. Muitos pacientes, porém, não resistem a tais procedimentos por serem agressivos também às células saudáveis, causando danos que acarretam no surgimento de outras enfermidades (LOPES; CHAMMAS; IYEYASU, 2013; PALUMBO *et al.*, 2013).

Nas últimas décadas a busca por um bioativo capaz de inibir o surgimento ou crescimento de tumores tem se tornado o objeto de pesquisa em diversas áreas, um exemplo é a de produtos naturais marinhos, Pinto (2002) relata que algumas algas

podem inibir o crescimento celular tumoral, e que várias moléculas isoladas apresentam atividade antitumoral como os polissacarídeos sulfatados, fucoxantinas e terpenos (COSTA, 2008; KRÜGER, 2018; LOPES, 2018; NEWMAN, 2014)

A literatura mostra a evolução das pesquisas com o potencial das algas como fontes de agentes antitumorais, há levantamentos estatísticos que constataam uma menor incidência de câncer específicos em populações orientais, os quais têm uma dieta rica no consumo de algas, que possuem metabolitos considerados quimiopreventivos (YUAN, 2006). Desta forma é relevante que esse organismo tenha sua capacidade bioativa mais bem analisada, partindo do pressuposto que seria um grande avanço para o tratamento anticâncer, tanto para o paciente, que sofreria menos com um tratamento baseado em organismos naturais, quanto para redução tumoral.

3.3 O Modelo *Drosophila*

A *Drosophila melanogaster* (MEIGEN, 1830), conhecida como mosca de fruta, tem sido usada como um organismo modelo em pesquisa médica e científica há mais de um século. A primeira pessoa a usar *Drosophila melanogaster* dessa maneira foi William Ernest Castle (1867-1962), professor na Universidade de Harvard (STEPHENSON; METCALFE, 2013), desde então ela é usada nos mais variados testes que visem avaliar os efeitos mutagênicos, recombinogênicos e genotóxicos.

A busca por novos fármacos com baixa toxicidade genética vem aumentando ao longo dos anos, e para isso vários organismos são utilizados em testes biológicos dessa natureza, a *D. melanogaster* é um dos organismos modelos mais viáveis, pois, apresenta homologia genômica com humanos, se tornando um modelo para compreender a biologia humana e os processos de algumas doenças (ZOLFAGHARI *et al.*, 2015).

O baixo custo de manutenção aliado a um rápido ciclo de vida, farto material de consulta com muitos livros publicados, sítios na internet como o Flybase (<http://www.flybase.org>), o banco de dados do Berkeley Drosophila Genome Project associado à enciclopédia de *Drosophila* (<http://fruitfly.berkeley.edu>), são

considerados também aspectos positivos para a utilização da genética e biologia molecular dos organismos referidos (ROBERTS, 1998; ASHBURNER, 2005).

Entre os testes que podem ser realizados para se avaliar o dano ao DNA está o Ensaio Cometa, conhecido como eletroforese em gel de célula individualizada, é uma técnica que tem sido empregada para a detecção de danos primários no DNA. É um método de investigação genotoxicológica, que pode mensurar possíveis danos no material genético de células isoladas, mediante a combinação entre técnicas bioquímicas e testes citogenéticos (HARTMANN; SPEIT, 1997; CARITÁ, 2010).

O teste SMART, conhecido como teste de asa é outro método que emprega duas linhagens de moscas e possibilita a detecção simultânea de mutação gênica, aberrações cromossômicas - representadas por eventos aneugênicos e clastogênicos - e/ou recombinação somática (GRAF *et al.*, 1984). Tais alterações são induzidas nas células dos discos imaginais que, após inúmeras divisões mitóticas, darão origem às asas 11 dos adultos com seus pelos ou tricomas.

A análise é realizada por meio da observação de grupos de células (clones mutantes) nas asas dos adultos que expressam fenotipicamente os genes marcadores *flr³* ou *mwh*, responsáveis pelas mudanças na forma dos pelos. Estes fenótipos refletem a ocorrência de alterações genéticas originadas pela perda de heterozigose nas células larvais (GRAF *et al.*, 1984).

O efeito genotóxico e/ou mutagênico pode ser usado para se saber o nível de danos causados por poluentes atmosféricos (SANTANA *et al.*, 2018), por fármacos (ABREU, 2011) e fitoterápicos, comumente utilizados pela população geral. Lopes, (2017) analisou os extratos aquoso, etanólico e de acetato de etila das plantas utilizadas em fitoterápicos *Turnera subulata* (Flor do o Guarujá), *Spondia mombin* (Cajazeira) e *Stemona tuberosa* (umbuzeiro) e observou que esses extratos apresentam efeito genotóxico estatisticamente significativo sob as condições experimentais com *D. melanogaster*.

3.4 Antioxidante

O estresse oxidativo ocorre através da formação de radicais livres, devido a um desequilíbrio nos sistemas de proteção antioxidante e pode causar danos graves a nível celular. Tais radicais surgem da atividade extracelular por meio de ações do ambiente, como a radiação solar, ou intracelular pela atividade de organelas como as mitocôndrias, membrana celular, atingindo o DNA. Este processo pode acarretar o aparecimento de diversas enfermidades como as doenças neurodegenerativas e arteriosclerose. Desempenham ainda um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (ANDERSON, 1996; BIANCHI, 1999; CABRAL, 2011).

Uma das formas de evitar a formação dos radicais livres é alimentação. As frutas por apresentarem um alto teor de metabolitos antioxidante, como a vitamina C, E e A, os flavonoides e carotenoides são extremamente importantes na intercepção dos radicais livres (BIANCHI, 1999).

Se tratando de carotenoides as algas se revelam como fontes importantes de proteínas, iodo, vitaminas e minerais, vários estudos comprovam que as algas pardas apresentam ótima atividade antioxidante, isso ocorre devido ao estresse ambiental que esses organismos enfrentam, tais com, mudança de temperatura da água durante a maré baixa, exposição à radiação solar, e predação por herbívoros. (ALVES, 2011; CABRAL, 2011; ROCHA, 2007; TORRES *et al.*, 2017).

A linha de pesquisa em produtos naturais envolvendo as técnicas antioxidantes como DPPH, tem se desenvolvido muito, na área farmacêutica, utilizando extratos ou compostos isolados, como os polissacarídeos, proteínas, e fenóis, isolados de algas pardas com propriedades antioxidantes (BALBOA *et al.*, 2013; PHILIPPUS *et al.*, 2016).

O método do DPPH foi descrito inicialmente por Blois (1958) e, posteriormente, adaptado por Brand-Williams *et al.* (1995), é um dos métodos para se determinar a atividade antioxidante mais antigo. Quanto maior poder oxidativo de uma substância, mais clara amostra de torna. As substâncias usadas como padrões são as sintéticas, Hidroxianisol de Butila (BHA) e o Hidroxitolueno de Butila (BHT) e as naturais com destaque para o Ácido Ascórbico, Ácido gálico e a Quercetina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta e Identificação da Alga

As coletas foram realizadas na praia do Cupe situada na porção norte da Vila de Porto de Galinhas, com as seguintes coordenadas S 07° 36.511' W 034° 47,620, na praia de Itapuama localizada no município do Cabo de Santo Agostinho-PE, com coordenadas S 08° 53.711' W 035° 08.156', e na praia de Ponta de Pedras distrito de Goiana, nas coordenadas S 07° 36.511' W 034° 47.620 nos dias 23/06/2017, 26/05/2017 e 27/05/2017 respectivamente, todas localizadas no estado de.

4.2 Triagem do Material algal

Todo o material foi triado e etiquetado em campo e posteriormente transportado para o Laboratório de Biodiversidade do Centro Acadêmico de Vitória onde foram mantidas sob refrigeração em freezer a -20°C até o dia da identificação, limpeza e secagem, com intuito de minimizar possíveis alterações nas propriedades químicas. Os espécimes identificados foram submetidos à limpeza manual utilizando sempre água destilada para remoção de areia, epífitas e fauna acompanhante. Em seguida as algas foram dispostas em jornal desdobrado sobre a bancada do laboratório, ao abrigo de irradiação solar direta, permanecendo nessa condição até a secagem total, após esse processo acondicionou-se a biomassa em recipientes devidamente limpos, secos e com tampas.

4.3 Obtenção dos Extratos Orgânicos

A obtenção dos extratos foi efetuada de acordo com Arokiyaraj *et al.* (2009) com modificações nos solventes utilizados. O material botânico foi seco à temperatura ambiente, em seguida foi moído em triturador elétrico, pesado e armazenado. Em Erlenmeyer foi adicionado 15g da alga triturada, imerso em 150 ml de éter, o extrato ficou sobre agitação manual por dez minutos, em seguida foi envolvido com folha de alumínio, mantido na capela ao abrigo da luz e em

temperatura ambiente por 24 horas, após esse tempo procedeu-se à filtração utilizando filtro Whatman, seguindo-se às sucessivas extrações a frio. O extrato foi evaporado sob vácuo em rotaevaporador até se obter massa pastosa que foi acondicionada em vidros de penicilina, previamente pesados, e, em seguida de armazenada em dessecador até se obter peso constante. A fração sólida foi extraída, na sequência com clorofórmio, e acetona, seguindo-se a metodologia descrita acima. Ao final da última extração, ao material seco foi acrescentado, em erlenmeyer, 200 ml de água destilada, em seguida o material foi submetido a banho-maria a temperatura de 80 °C, por cerca de 90 minutos. Após essa etapa o extrato foi filtrado, armazenado em freezer - 80 °C até o processo de liofilização.

4.4 Cromatografia em Camada Delgada

A cromatografia em camada delgada foi realizada com placas de sílica gel 60 F254 (Merck), utilizando 10 µL de cada extrato solubilizado em etanol na concentração de 10mg/L, utilizando o sistema Diclorometano (CH₂Cl₂) e Acetato de Etila (AcOEt) na proporção 7:3(v.v), como fase móvel. As placas passaram por inspeção sob luz ultravioleta, nos comprimentos de ondas entre 254 e 365nm, em seguida as placas foram reveladas com Iodo, seguido de aquecimento em placa aquecedora, para melhor visualização das bandas e identificação do fator de retenção. Os compostos foram identificados por comparação de seus fatores de retenção (R_f) com dados da literatura.

4.5 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG - MS)

Os extratos etéreos de *D. mertensis* foram submetidos à análise em Cromatografo gasoso acoplado a espectrômetro de massas (Shimadzu QP 5050A acoplado a coluna DB-5 (Agilent J & W; 30 m 0,25 mm 0,25 mm). Seguindo-se a metodologia descrita por Pinheiro *et al.* (2019), com modificações. Foi injetado 1 µL do extrato orgânico diluído 1:50, (v / v) em acetona. A amostra foi injetada no modo splitless. A temperatura do forno foi ajustada em 70 °C por 4 min., e aumentada com

taxa de 4 °C / min. até 280 °C, sendo mantida a esta temperatura durante 15 min. A pressão da fase móvel, hélio, foi mantida a 40 kPa, sob fluxo de 0.8 mL/min. e fluxo total de 5.8mL/min. A interface com MS foi a 280 °C. Os espectros de massa foram adquiridos a 70 eV em modo de ionização por impacto de elétrons, com uma velocidade de scan/s de m/z 30 à 450. Os compostos eluídos foram identificados por comparação entre os espectros de massa e os espectros de massa dos padrões autênticos disponíveis na biblioteca de referência NIST11 e, tudo integrado no software GCMS Postrun Analysis Shimadzu. As áreas de pico em cromatogramas foram integradas a fim de obter a sinal iônico total, e os valores foram usados para determinar a proporção relativa de cada composto.

4.6 Avaliação da Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MOSMANN, 1983). As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram NCI-H292 (carcinoma mucoepidermóide de pulmão humano) HCT-116 (adenocarcinoma colorretal humano) e MCF-7 (câncer de mama humano) mantidas em meio de cultura DMEM. Os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂.

As células MCF-7, HCT-116 e NCI-H292 (105 células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços contendo e incubadas por 24 h. Em seguida as amostras dissolvidas em 1 mL de dimetilsulfoxido (DMSO) e posteriormente em meio de cultura até a concentração final de 0,1% foram adicionadas aos poços. O fármaco doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizada como padrão. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a percentagem de inibição foi calculada no programa GraphPad Prism 7.0.

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras com atividade (95 a 100 % de inibição), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 70 a 90%) e sem atividade (inibição de crescimento menor que 50 %) (RODRIGUES *et al.*, 2014).

4.7 Ensaio Cometa

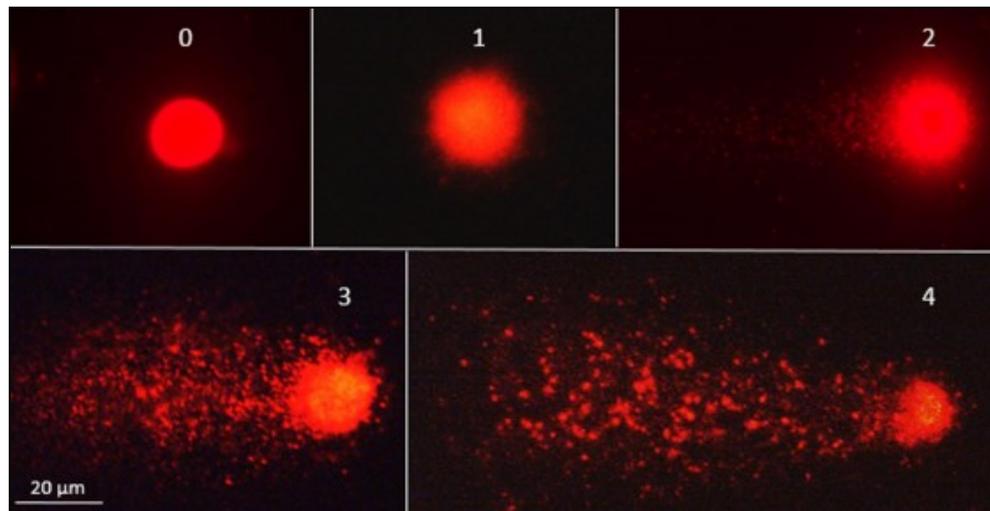
Foram utilizadas 60 larvas de *D. melanogaster* da linhagem Oregon-R, em terceiro estágio larval. Foram expostas a tratamento crônico por 24h, dispostas em potes contendo 0.9g de purê de batata desidratada e o extrato etéreo que foi escolhido por apresentar maior rendimento dentre os extratos, diluídos em água, Tween 80 e Etanol. Nas seguintes concentrações 10,24 mg/mL, 5,12 mg/mL, 2,56 mg/mL, 1,28 mg/mL, além de um grupo controle negativo apenas com o solvente e um controle positivo com ciclofosfamida (1mg/mL). Após a exposição por 24h seguiu-se os seguintes passos:

- Preparação das lâminas (previamente lixadas e banhadas em agarose);
- Retirada da hemolinfa das larvas tratadas, na presença de anticoagulante (EDTA).
- Centrifugação do material biológico.
- Preparação das lâminas com o material biológico, etapa da lise celular, processo de neutralização, processo de desidratação, eletroforese.
- Coloração e análise ao microscópio de fluorescência dos danos genéticos. Uma abordagem, que classifica os cometas em categorias de zero a quatro foi utilizada, com base no comprimento de migração e/ou na proporção relativa percebida de DNA na cauda (Figura 4), atribuindo um valor numérico a cada classe de migração. Diante disso a extensão média de migração de DNA entre as células pode ser calculada gerando um índice e frequência de dano (ID/FD), embora o parâmetro ID seja subjetivo ele é altamente

correlacionado com as análises de imagem geradas pelos softwares (SILVA, 2012).

As lâminas foram coradas com 50 mL de GelRed™ diluído em água destilada (1: 500). Em seguida observadas em microscópio de fluorescência (Zeiss-Imager M2), equipado com um filtro Alexa-Fluor 546 na ampliação 400x. Segundo Collins *et al.* (2014), o ensaio reflete o relaxamento do DNA super enrolado embebido em agarose, e a migração do DNA de células individuais (nucleoides) expostas a agentes genotóxicos. No total, 100 células foram inspecionadas (50 em cada uma das duas lâminas) para cada réplica, totalizando 300 células analisadas por local.

Figura 4 - Os cinco níveis de dano genético (0 a 4) com base no comprimento e quantidade de DNA nas caudas dos cometas.



As imagens foram utilizando hemócitos coletados de larvas de *D. melanogaster* coradas com GelRed™ sob microscopia de fluorescência.

Fonte: Verçosa *et al.* (2017), com permissão.

Orientações e recomendações internacionais para o Ensaio Cometa consideram a análise visual dos cometas um método de avaliação bem validado (TICE *et al.*, 2000). A análise estatística final dos resultados foi feita através de testes paramétricos ou não paramétricos dependendo de os resultados apresentarem ou não distribuição normal: teste Kolmogov Smirnoff ou Kruskal-Wallis (comparações múltiplas). Utilizamos os softwares Statistica (versão 7.0) ou SAS System (versão 9.0).

Os dados foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) e o teste post hoc de Bonferroni no software STATA versão 1.2. Após a avaliação dos

requisitos da ANOVA relacionados à normalidade residual e homocedasticidade da variância. Diferenças estatisticamente significativas foram estabelecidas em $P < 0,05$.

4.8 Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

Para aplicação do teste SMART realizou-se o cruzamento padrão entre fêmeas *flr*³ e machos *mwh* que originou larvas com duas constituições genótípicas: (i) *mwh*^{+/+} *flr*³ (trans-heterozigotas); (ii) *mwh*^{+/}TM3, BdS 15 (heterozigotas TM3) (FREI *et al.*, 1992). As larvas permaneceram em tratamento por 48 horas (tratamento crônico) no extrato etéreo das praias de Cupe, Itapuama e Ponta de Pedras, diluídos em Tween 80, etanol e água destilada, nas concentrações 10,24; 5,12; 2,56; 1,28; 0,64; 0,32 e 0,16 mg/mL. O controle negativo foi realizado com administração apenas dos diluentes da amostra. As moscas nascidas foram retiradas dos tubos, contadas e lavadas em solução fisiológica e estocadas em etanol 70%.

As asas trans-heterozigotas dos adultos eclodidos, cinco pares de fêmeas e cinco de machos (ACIOLE, 2012) foram retiradas do corpo com auxílio de pinças de relojoeiro (nº 5), microscópio estereoscópico (lupa) e placa de Kline, mergulhadas em solução de FAURE (preparada com 30g de goma arábica, 20mL de glicerol, 50g de hidrato cloral e 50mL de água), depois foram retiradas da solução e distendidas sobre a superfície de lâminas de vidro, e mantidas por um período de 24 horas para secagem, após esse tempo colocou-se as lamínulas (24 x 32 mm), contendo uma gota da solução de FAURE, permanecendo por mais 24 horas pressionadas com cubos de metal - com peso total de aproximadamente 400g - para uma perfeita aderência das asas às lâminas.

As análises foram realizadas com microscópio óptico com aumento de 400x, para determinar quantitativamente o potencial recombinogênicos dos compostos, pois em indivíduos com cromossomos estruturalmente normais, eventos mutacionais e recombinacionais levam à formação de manchas únicas ou gêmeas.

Em contraste, em indivíduos balanceadores heterozigotos, todos os eventos recombinacionais são eliminados devido a inversões múltiplas, e só eventos mutacionais podem dar origem a manchas simples. A análise dos tricomas presentes nas asas dos adultos permite a identificação de manchas de pelos

mutantes: (i) simples *mwh* ou *flr³* , quando somente um dos marcadores se expressar e (ii) gêmeas quando ambos os fenótipos mutantes - pelos múltiplos (*mwh*) e com a base alargada (*flr³*) - estiverem presentes. Os resultados foram comparados aos tratamentos do controle negativo (sem os compostos) através do teste estatístico Binomial Condicional Kastenbaum.

4.9 Teste Antioxidante – DPPH

O método do DPPH seguiu a metodologia adaptada por Brand-Williams *et al.* (1995), com a modificação feita por, Furlan *et al.* (2015), os padrões usados neste teste foram: BHT, ácido gálico e quercetina.

Primeiramente prepararam-se as soluções de DPPH, utilizando 1,6 mg de DPPH em volume final de 50 mL de metanol, do Ácido Gálico, obtida através da dissolução de 1 mg de ácido gálico em 1 mL de metanol, do BHT utilizou 1 mg deste produto dissolvido em 1 mL de metanol P.A e de Quercetina utilizando a mesma proporção dos outros padrões, os extratos orgânicos algais foram dissolvidos seguindo as mesmas proporções dos padrões.

Em seguida o material foi disposto em microplaca de 96 poços, nas seguintes concentrações: 31.25, 62.5, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL. As placas foram incubadas por 30 min protegida da luz direta. Após esse tempo, as amostras passaram por leitura das absorbâncias em leitor de ELISA a 25° no escuro, como os extratos apresentaram coloração esverdeada, precisou fazer o teste do branco da amostra.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Rendimento dos Extratos

De acordo com a tabela 1 observa-se que a variação entre os extratos é discreta quanto à porcentagem do rendimento, sendo mais evidente no extrato aquoso. Essa variação pode interferir nos resultados dos testes de forma positiva ou negativa, como pode se observar nos dados obtidos da atividade citotóxica e antioxidante.

Tabela 1 - Rendimento dos Extratos Brutos de *Dictyota mertensii* a partir da divisão do peso do extrato dividido pelo peso de massa algal. Peso do extrato/ porcentagem de rendimento.

PRAIA	SOLVENTES			
	Éter	Clórofórmio	Acetona	Água
Cupe	1,16/7,73%	0,09/0,6%	0,1319/0,87%	0,86/5,76%
Itapuama	0,77/5,13%	0,07/0,46%	0,1320/0,87%	1,31/8,75%
P. de Pedras	0,095/6,33%	0,09/0,6%	0,1279/0,85%	0,82/5,51%

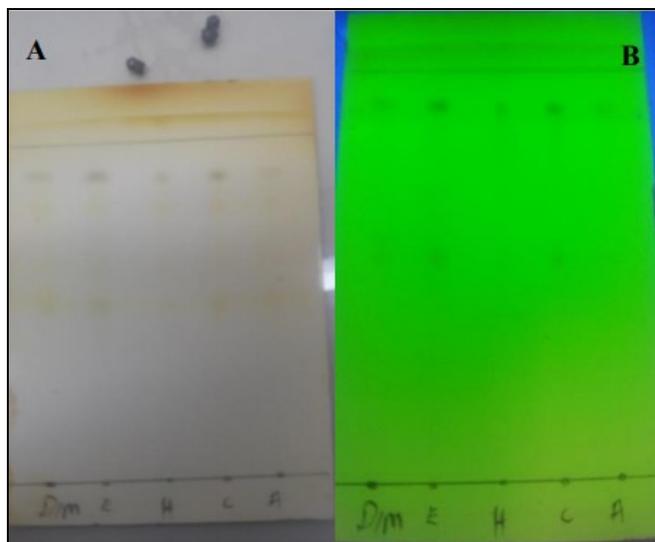
*Calculados de 15 g de pó algal.

Essa variação pode ocorrer por fatores intrínsecos ou extrínsecos ainda não tão bem estabelecidos, pois pode acontecer entre indivíduos dentro de uma mesma população (PAUL; VAN ALSTYNE, 1988a,b; PUGLISI; PAUL, 1997; MATLOCK *et al.*, 1999) ou entre populações da mesma espécie que crescem em diferentes regiões (PAUL; FENICAL, 1986, 1987; PAUL *et al.*, 1987; PAUL; VAN ALSTYNE, 1988a), pode ocorrer ainda pela diferença de profundidade no ambiente marinho (GERWICK *et al.*, 1985), pelo nível de predação, (PEREIRA, 2004), ou por estresse ambiental, tais como intensidade luminosa (CRONIN; HAY, 1996c) radiação ultravioleta (PAIVA *et al.*, 1997) e dessecação (RENAUD *et al.*, 1990), fatores que aumentam o estresse oxidativo dos organismos algais.

5.2 Cromatografia em Camada Delgada

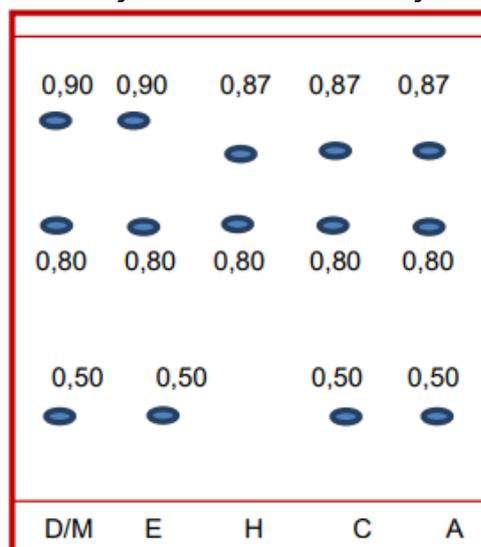
A análise cromatográfica em camada delgada (CCD) demonstrou a possível presença de diterpenos, $R_f = 0,87$ e $0,80$, e esteróis $R_f = 0,50$ (FREITAS, 2006). Na (Figura 5) observam-se as bandas após a revelação com iodo, em A, e B visualização sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254nm e 366nm. Na (Figura 6) representação do R_f de cada banda apresentadas pelos extratos analisados.

Figura 5 - CCD dos extratos de *D. mertensii*



A) placa na luz branca revelada com iodo, B) placa na luz Ultravioleta.
Fonte: A autora.

Figura 6 - Representação do fator de retenção de cada extrato.

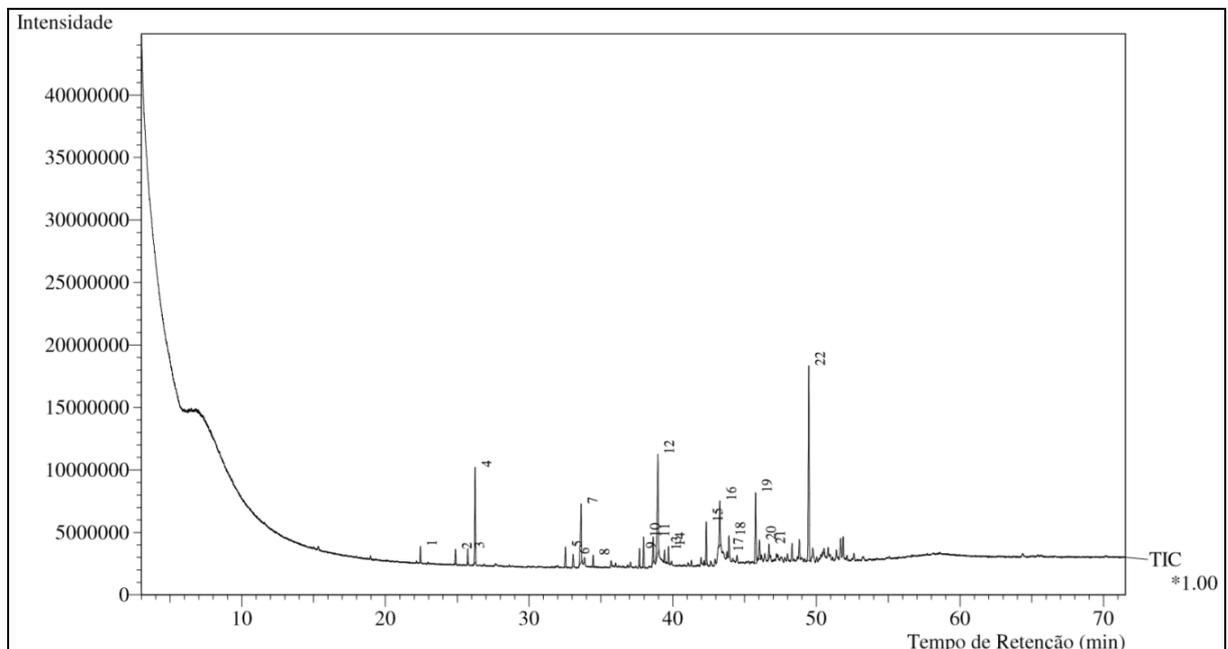


D/M (Diclorometânico/Metanólico), E (etéreo) H (Hexânico), C (Clorofórmico) e A (Acetônico)
Fonte: A autora.

5.3 Análise por Cromatografia Gasosa acoplada a espectrômetro de massas

A análise por CG-MS dos extratos revelou a presença de um padrão de picos distinto para cada um dos extratos analisados, sendo mais complexo o extrato da praia de Cupe. Constituído por 22 componentes distintos. Os mais concentrados foram (picos 4, 7, 12, 19 e 22), (Figura 7, Tabela 2). O cromatograma da praia de Itapuama apresentou um conjunto de 7 picos (Figura 9, Tabela 3). Já o extrato de Ponta de Pedras apresentou apenas três picos (Figura 11, Tabela 4).

Figura 7 - Cromatograma em CG-MS do extrato etéreo de *D. mertensii* coletado na praia de Cupe



Fonte: A autora.

Tabela 2 - Composição do extrato etéreo de *D. mertensii* coletada em Cupe

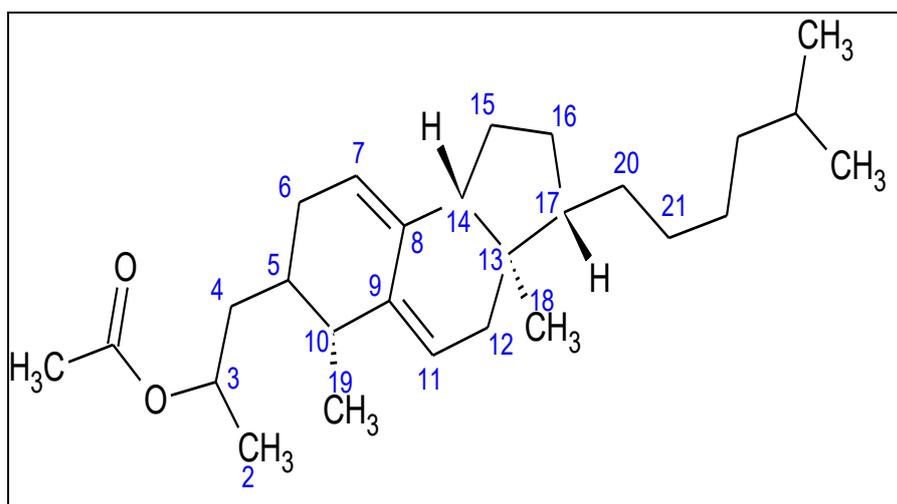
Componente/Tr (min.)	Composto (provável)	%	Pico base, m/z
1 - 22,4	n-pentadecano	1,45	57,1
2 - 24,8	7-metoxi-2,2,4,8-tetrametiltriciclo[5,3,1,0(4,11)undecano	1,25	165,1
3 - 25,7	n-octadecano	1,18	57,1
4 - 26,2	Fenol,4,6-di(1,1-dimetiletil)-2-metil	9,5	205,2
5 - 32,5	Ácido tridecanóico	1,83	74,05
6 - 33,0	Ácido propiônico	1,39	43,0
7 - 33,6	Ácido palmítico	8,77	73,0

8 - 34,4	Ácido Mirístico	1,19	88
9 - 37,6	Ácido metil-palmitoléico	1,66	55,0
10 - 37,9	Éster metilado do ácido mirístico	2,79	74,1
11 - 38,6	Ácido Trans-13-octadecenóico	2,95	55,0
12 - 38,9	Ácido tetradecanóico	14,83	43,0
13 - 39,4	Ácido octadecanóico	1,21	55,0
14 - 39,7	Ácido Pentadecanóico	1,59	88,1
15 - 42,3	Ácido oleico	4,18	55,0
16 - 43,2	Ácido 6-octadecanóico	5,13	55,0
17 - 43,7	Ácido eicosanóico	0,64	55,0
18 - 43,9	Ácido 9-etil- octadecanóico	2,25	55,1
19 - 45,7	5-azulenometanol	8,62	43,0
20 - 46,0	1H,2,8a-metanociclopenta[a]- ciclopropa[e]ciclodece-11-ona	2,26	93,0
21 - 46,7	5-beta-pregnano	1,53	41,0
22 - 49,4	Acetato de Colesta-5,7,9(11)-trien-3-ol	23,77	43,0

Fonte: A autora.

Foram identificados no extrato oriundo de Itapuama 22 componentes, dentre os quais derivados do citosterol (20-22) e ácidos graxos. Dentre estes o que apresentou maior concentração foi o pico 22, Acetato de Colesta-5,7,9(11)-trien-3-ol (23,77%) (Figura 7), possivelmente um terpeno derivado do citosterol. Estes dados estão de acordo com Teixeira (2013) que relata a presença no grupo *Dicliota* destas classes de compostos e derivados terpênicos.

Figura 8 - Provável estrutura do componente 22, Acetato de Colesta-5,7,9(11)-trien-3-ol

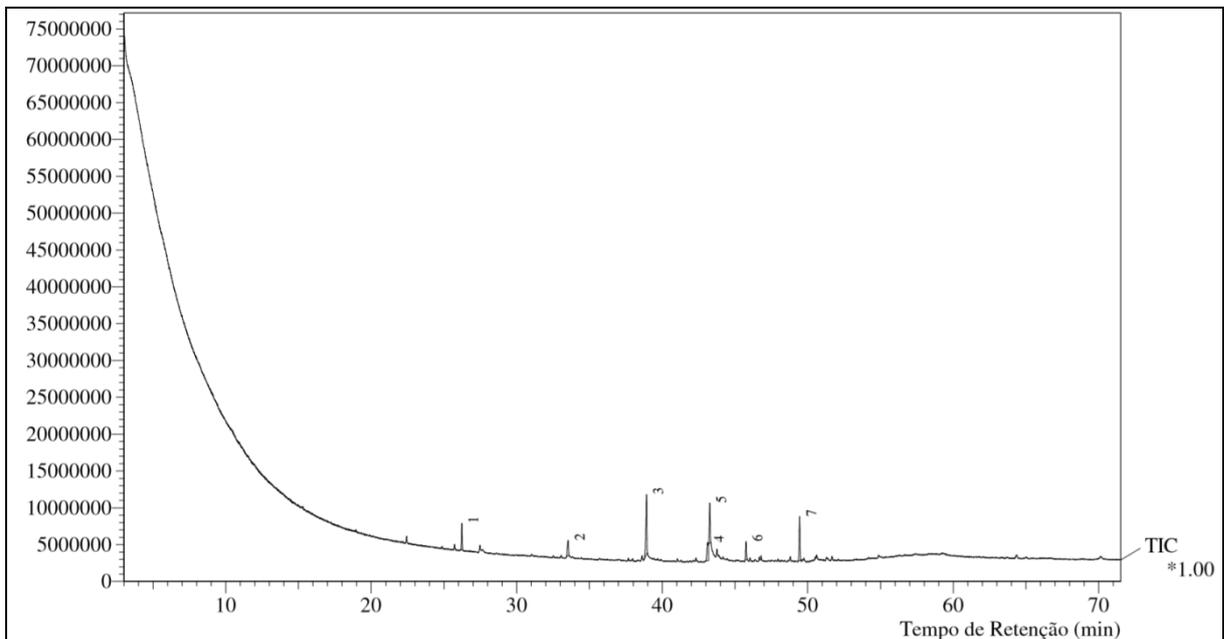


Fonte: A autora.

O extrato etéreo de *D. mertensii*, coletado na praia de Itapuama apresentou um padrão distinto daquele observado para Cupe (Figura 8), caracterizando-se por apresentar menos componentes. Foram identificados ácidos graxos (2-5) e

derivados terpênicos do citosterol (7). Dentre estes o que apresentou maior concentração foi o pico 3 (29,43%), ácido tridecanóico, figura 8.

Figura 9 - Cromatograma em CG-MS do extrato etéreo de *D. mertensii* coletado na praia de Itapuama



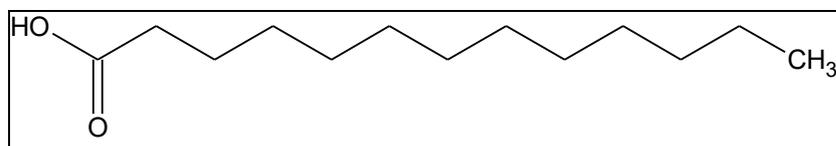
Fonte: A autora

Tabela 3 - Composição do extrato etéreo de *D. mertensii* coletada em Itapuama

Componente/Tr (min.)	Composto (provável)	%	Pico base, m/z
1 - 26,2	Fenol,4,6-di(1,1-dimetiletil)-2-metil	9,5	205,2
2 - 33,5	Ácido palmítico	8,69	73,0
3 - 38,9	Ácido tridecanóico	29,43	43,0
4 - 43,1	Ácido linoleico	10,87	55,0
5 - 43,2	Ácido 6-octadecenóico	16,06	55,0
6 - 45,7	5-azulenometanol	7,26	43,0
7 - 49,4	Acetato de Colesta-5,7,9(11)-trien-3-ol	18,19	43,0

Fonte: A autora

Figura 10 - Provável estrutura do componente 3, Ácido tridecanóico.

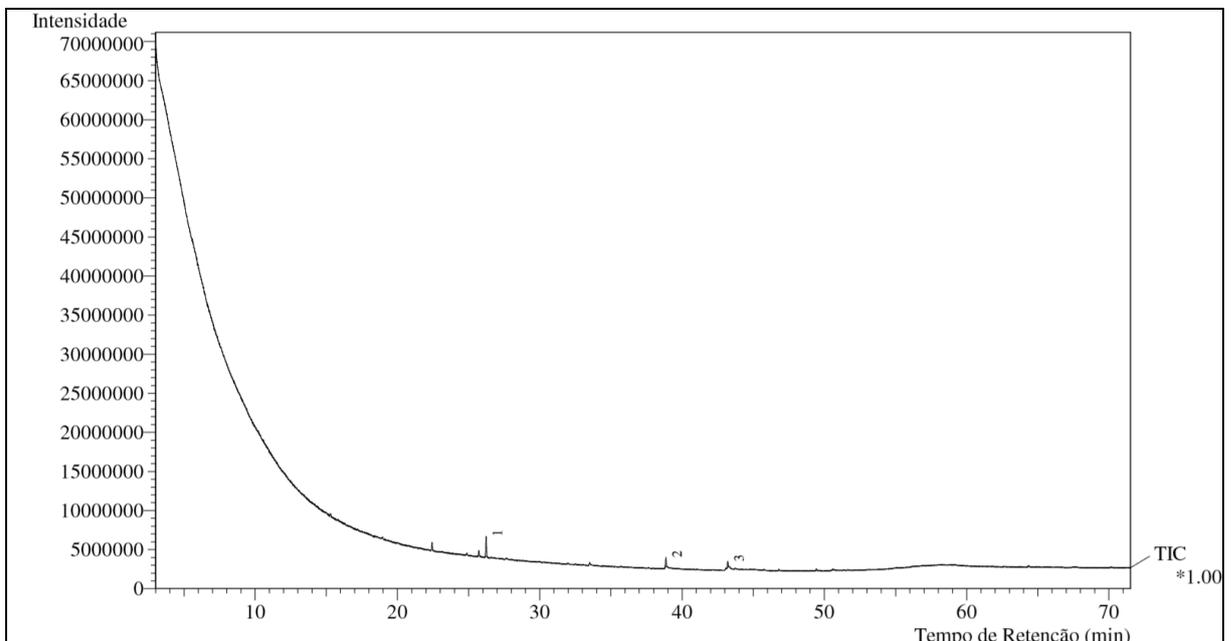


Fonte: A autora

O extrato oriundo da praia de Pontas de Pedra apresentou a menor diversidade de componentes. Foram observados apenas três picos, Tr 26,2; 38,8 e 43,2 (Figura 10). Estes componentes foram identificados como, fenol,4,6-di-(1,1-dimetiletil)-2-metil, ácido mirístico e ácido 6-octadecenóico, respectivamente (Tabela 4), sendo o composto que apresentou maior concentração o Fenol,4,6-di(1,1-dimetiletil)-2-metil (54,6%), estrutura descrita na figura 10.

As diferenças quantitativas e qualitativas nos extratos orgânicos das diferentes praias avaliadas podem possivelmente estar relacionadas à ação antrópica. Não foi identificada, entretanto, a presença de componentes mencionados na literatura como presentes na espécie, como derivados diterpênicos do Geraniol geraniol (Teixira V.L. 2013). Apesar disso, Fleury *et al.* (1996) descreve a presença derivados esteroides como o fucosterol e calinesterol para o grupo dictyota. Nossos estudos demonstram a presença de esteroide semelhante nos extratos de Cupe e Itapuama.

Figura 11 - Cromatograma em CG-MS do extrato etéreo de *D. mertensii* coletado na praia de Ponta de Pedra.



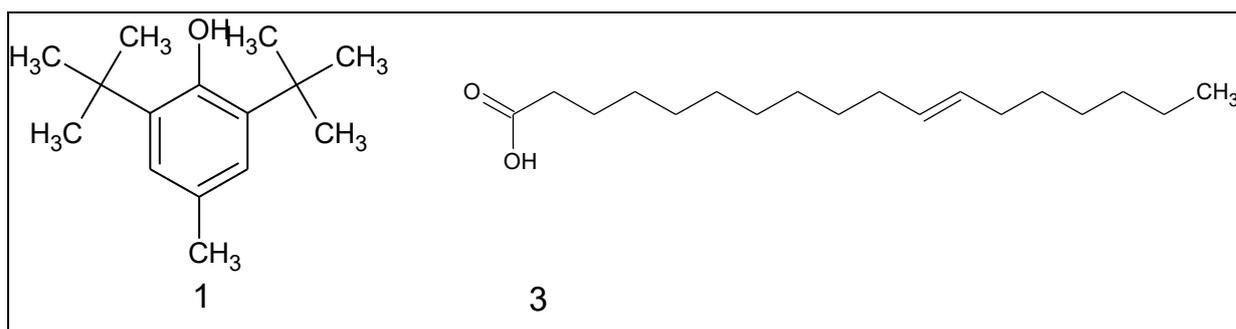
Fonte: A autora

Tabela 4 - Composição do extrato etéreo de *D. mertensii* coletada em Pontas de Pedras

Componente/Tr (min.)	Composto (provável)	%	Pico base, (m/z)
1 - 26,2	Fenol,4,6-di(1,1-dimetiletil)-2-metil	54,6	205,2
2 - 38,8	Ácido Mirístico	25,9	43,0
3 - 43,2	Ácido 6-octadecenóico	19,3	55,0

Fonte: A autora

Figura 12 - Provável estrutura do componentes 1 e 3, Fenol,4,6-di(1,1-dimetiletil)-2-metil e ácido 6-octadecenóico.



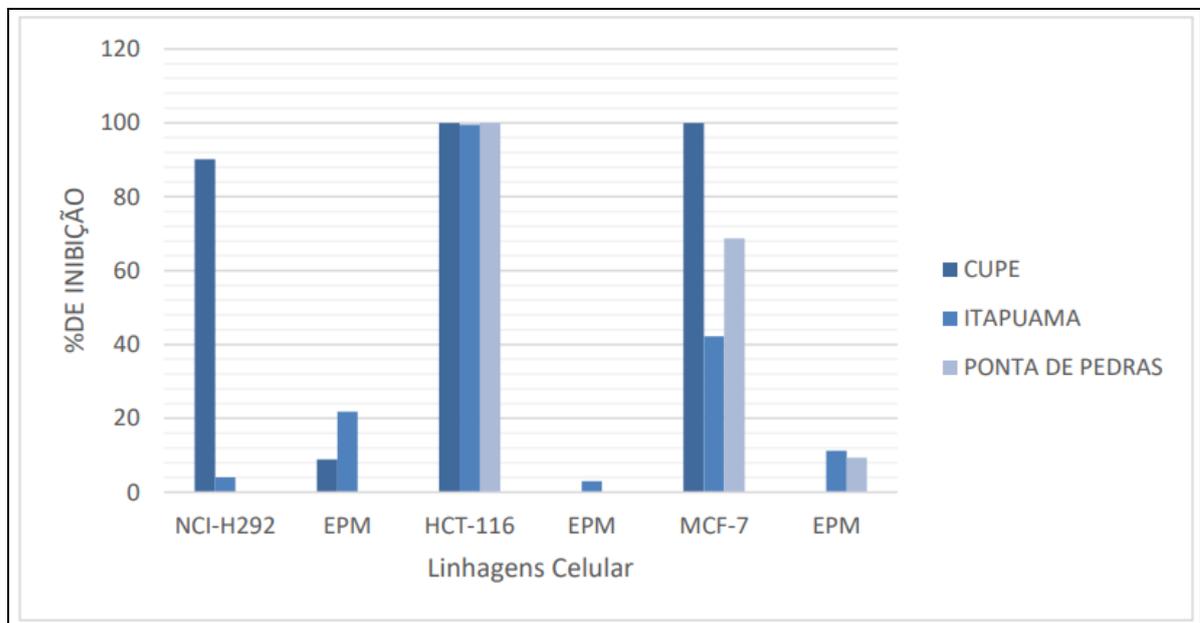
Fonte: A autora

5.4 Avaliação Citotóxica

De acordo com o método de análise descrito por Rodrigues *et al.* (2014) o extrato algal que apresentou um melhor resultado, quando se comparam as linhagens celulares foi o da praia do Cupe (C), seguido por Pontas de Pedras (PP) e a linhagem celular mais sensível foi a HCT-116 (adenocarcinoma colorretal humano). Os três extratos, no entanto, apresentaram um resultado inibitório significativo, como mostra a (Figura 12), mas, distinto para as demais células. Sem Cupe ativo frente a todas as linhagens, ponta de pedras ativo frente a HCT – 116 e MCF - 7 e inativo frente NCI – H292. Esse padrão distinto de resposta pode ser explicado por uma composição química diferente para os extratos. O que é evidenciado nos dados de CG, que descrevem 22 compostos para o extrato etéreo

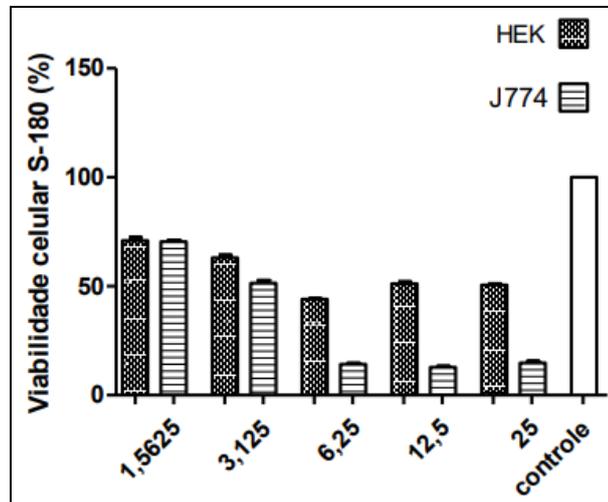
de Cupe, enquanto Ponta de Pedras apresenta apenas 7 compostos e Itapuama 3. Além disso o extrato de Cupe também apresenta um maior nível genotóxicidade. Os extratos obtidos com Diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (CH_3OH) exibiram uma taxa de inibição acima de 50% nas menores concentrações frente as linhagens celular, HEK e SARCOMA 180, observados na (Figura 13), porém o resultado desse extrato é inferior ao do extrato etéreo.

Figura 13 - Avaliação da taxa de inibição do extrato etéreo das praias de Cupe, Itapuama e Pontas de Pedras, nas linhagens NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HCT-116 (adenocarcinoma colorretal humano) e MCF-7 (câncer de mama humano), EPM (erro médio padrão).



Fonte: A autora

Figura 14 - Avaliação taxa de inibição do extrato de CH_2Cl_2 e CH_3OH (Diclorometano X Metanol), Cupe, frente as células tumorais de J774 (Sarcoma 180) e HEK (Células do Rim Embrionário Humano)



Fonte: A autora

5.5 Avaliação da genotoxicidade

Os resultados mostram que o extrato etéreo de Cupe apresentou, nas maiores concentrações, uma taxa de índice e frequência de danos maiores que o controle, e nas menores concentrações os índices eram maiores que o controle (Tabela 5). Já para na praia de Itapuama, as médias do índice de dano e da frequência de dano, foram diminuindo de acordo com a diminuição das concentrações testadas (Tabela 7), mesmo assim, pode-se observar que a maior concentração apresentou tanto ID quanto FD menores que o grupo controle. Diferentemente das anteriores, a praia de Pontas de Pedras, demonstrou que conforme a concentração testada iria diminuindo o índice de dano e a frequência de dano aumentavam, no entanto permaneceram bem abaixo do grupo controle em todas as concentrações (Tabela 9).

Segundo o teste estatístico ANOVA e o pós-teste Bonferroni, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparadas as concentrações testadas com o grupo controle, conforme tabela 6, da praia de Cupe. Na praia de Itapuama, a frequência de dano foi significativa em todas as concentrações testadas, quando comparadas com o grupo controle, pois apresentaram danos bem abaixo dos demonstrados pelo controle negativo. E quando comparada a frequência de dano

apresentada entre as concentrações 10,24 mg/mL e 1,28mg/mL, apresentaram diferença significativa (Tabela 8). Na praia de Pontas de Pedras, houve diferença estatisticamente significativa, tanto do ID quanto no FD, em todas as concentrações testadas em relação ao grupo controle negativo, uma vez que todas apresentaram dados bem abaixo do controle negativo (Tabela 10).

Esses dados podem estar relacionados com a composição química, essa praia foi a que apresentou um maior rendimento dos extratos, e um maior número de compostos, sugerindo que a pouca atividade antrópica na área tenha beneficiado as algas da região.

Tabela 5 - Avaliação do ID e FD em larvas da linhagem Oregon-R de *D. melanogaster* submetidas ao controle negativo e a diferentes concentrações (réplicas ^{a,b,c}) do extrato etéreo de *Dictyota mertensii* da Praia do Cupe/PE.

[]	Nível de dano genético					Índice e frequência de dano genético	
	0	1	2	3	4	*ID	**FD %
Controle -	87	9	2	2	0	19	13
Controle -	88	7	2	3	0	20	12
Controle -	86	7	4	3	0	24	14
Média	87	7,67	2,67	2,67	0	21	13,00
Desvio Padrão	1	1,15	1,15	0,58	0	2,65	1,00
10,24 mg/mL	81	9	5	5	0	34	19
10,24 mg/mL	85	9	3	3	0	24	15
10,24 mg/mL	89	6	0	4	1	22	11
Média	85	8	2,67	4	0,33	26,67	15,00
Desvio Padrão	4	1,73	2,52	1	0,58	6,43	4,00
5,12 mg/mL	83	13	2	2	0	23	17
5,12 mg/mL	82	12	2	4	0	28	18
5,12 mg/mL	90	8	1	1	0	13	10
Média	85	11	1,67	2,33	0	21,33	15,00
Desvio Padrão	4,36	2,65	0,58	1,53	0	7,64	4,36
2,56 mg/mL	97	3	0	0	0	3	3
2,56 mg/mL	94	3	1	2	0	11	6
2,56 mg/mL	93	2	1	4	0	16	7
Média	94,7	2,67	0,67	2	0	10,00	5,33
Desvio Padrão	2,08	0,58	0,58	2	0	6,56	2,08
1,28 mg/mL	95	3	2	0	0	7	5
1,28 mg/mL	93	4	2	1	0	11	7
1,28 mg/mL	96	3	0	1	0	6	4
Média	94,7	3,33	1,33	0,67	0	8,00	5,33
Desvio Padrão	1,53	0,58	1,15	0,58	0	2,65	1,53

Fonte: A autora.

Tabela 6 - Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. Análise do ID (abaixo da diagonal) e FD% (acima da diagonal) em larvas de *D. melanogaster* comparadas ao controle negativo e as diferentes concentrações do extrato etéreo de *Dictyota mertensii* da Praia do Cupe/PE.

Grupos	Controle negativo	10.24	5.12	2.56	1.28
Controle negativo		1.000	1.000	0.093	0.093
10.24	1.000		1.000	0.023	0.023
5.12	1.000	1.000		0.023	0.023
2.56	0.350	0.033	0.308		1.000
1.28	0.163	0.016	0.144	1.000	

* Diferença significativa P <0,05

Fonte: A autora.

Tabela 7 - Avaliação do ID e FD em larvas da linhagem Oregon-R de *D. melanogaster* submetidas ao controle negativo e a diferentes concentrações (réplicas ^{a,b,c}) do extrato etéreo de *Dictyota mertensii* da Praia de Itapuama/PE.

[]	Nível de dano genético					Índice e frequência de dano genético	
	0	1	2	3	4	*ID	**FD %
Controle -	87	9	2	2	0	19	13
Controle -	88	7	2	3	0	20	12
Controle -	86	7	4	3	0	24	14
Média	87	7,67	2,67	2,67	0	21	13,00
Desvio Padrão	1	1,15	1,15	0,58	0	2,65	1,00
10,24 mg/mL	91	4	2	3	0	17	9
10,24 mg/mL	91	5	1	3	0	16	9
10,24 mg/mL	92	3	2	3	0	16	8
Média	91,33	4	1,67	3	0	16,33	8,67
Desvio Padrão	0,58	1,00	0,58	0	0	0,58	0,58
5,12 mg/mL	92	3	2	3	0	16	8
5,12 mg/mL	93	1	2	4	0	17	7
5,12 mg/mL	92	5	1	2	0	13	8
Média	92,3333	3,00	1,66667	3,00	0	15,33	7,67
Desvio Padrão	0,58	2,00	0,57735	1,00	0	2,08	0,58
2,56 mg/mL	94	3	1	2	0	11	6
2,56 mg/mL	91	5	2	2	0	15	9
2,56 mg/mL	93	4	2	1	0	11	7
Média	92,67	4,00	1,67	1,67	0	12,33	7,33
Desvio Padrão	1,53	1,00	0,58	0,58	0	2,31	1,53
1,28 mg/mL	95	2	0	1	1	9	5
1,28 mg/mL	96	2	0	2	0	8	4
1,28 mg/mL	97	0	1	2	0	8	3
Média	96	1,33	0,33	1,67	0,33	8,33	4,00
Desvio Padrão	1	1,15	0,58	0,58	0,58	0,58	1,00

Fonte: A autora.

Tabela 8 - Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. Análise do ID (abaixo da diagonal) e FD% (acima da diagonal) em larvas de *D. melanogaster* comparadas ao controle negativo e as diferentes concentrações do extrato etéreo de *Dictyota mertensii* da Praia de Itapuama/PE.

Grupos	Controle negativo	10.24	5.12	2.56	1.28
Controle negativo		0.003*	0.001*	0.000*	0.000*
10.24	0.118		1.000	1.000	0.002*
5.12	0.039	1.000		1.000	0.012
2.56	0.002*	0.251	0.767		0.022
1.28	0.000*	0.004*	0.010	0.251	

* Diferença significativa P <0,05

Fonte: A autora.

Tabela 9 - Avaliação do ID e FD em larvas da linhagem Oregon-R de *D. melanogaster* submetidas ao controle negativo e a diferentes concentrações (réplicas ^{a,b,c}) do extrato etéreo de *Dictyota mertensii* da Praia de Pontas de Pedras/PE

[]	Nível de dano genético					Índice e frequência de dano genético	
	0	1	2	3	4	*ID	**FD %
Controle -	87	9	2	2	0	19	13
Controle -	88	7	2	3	0	20	12
Controle -	86	7	4	3	0	24	14
Média	87	7,67	2,67	2,67	0	21	13,00
Desvio Padrão	1	1,15	1,15	0,58	0	2,65	1,00
10,24 mg/mL	99	1	0	0	0	1	1
10,24 mg/mL	98	2	0	0	0	2	2
10,24 mg/mL	98	2	0	0	0	2	2
Média	98,33	1,67	0	0	0	1,67	1,67
Desvio Padrão	0,58	0,58	0	0	0	0,58	0,58
5,12 mg/mL	97	3	0	0	0	3	3
5,12 mg/mL	98	1	0	1	0	4	2
5,12 mg/mL	97	2	0	1	0	5	3
Média	97,33	2	0	0,67	0	4,00	2,67
Desvio Padrão	0,58	1,00	0	0,58	0	1,00	0,58
2,56 mg/mL	97	2	0	1	0	5	3
2,56 mg/mL	98	1	0	1	0	4	2
2,56 mg/mL	98	1	0	1	0	4	2
Média	97,67	1,33	0	1,00	0	4,33	2,33
Desvio Padrão	0,58	0,58	0	0,00	0	0,58	0,58
1,28 mg/mL	98	1	0	1	0	4	2
1,28 mg/mL	98	1	0	1	0	4	2
1,28 mg/mL	97	1	0	2	0	7	3
Média	97,67	1,00	0	1,33	0	5,00	2,33
Desvio Padrão	0,58	0,00	0	0,58	0	1,73	0,58

Tabela 10 - Resultados com diagnóstico estatístico pelo teste ANOVA e pós-teste Bonferroni. Análise do ID (abaixo da diagonal) e FD% (acima da diagonal) em larvas de *D. melanogaster* comparadas ao controle negativo e as diferentes concentrações do extrato etéreo de *Dictyota mertensii* da Praia Pontas de Pedras/PE.

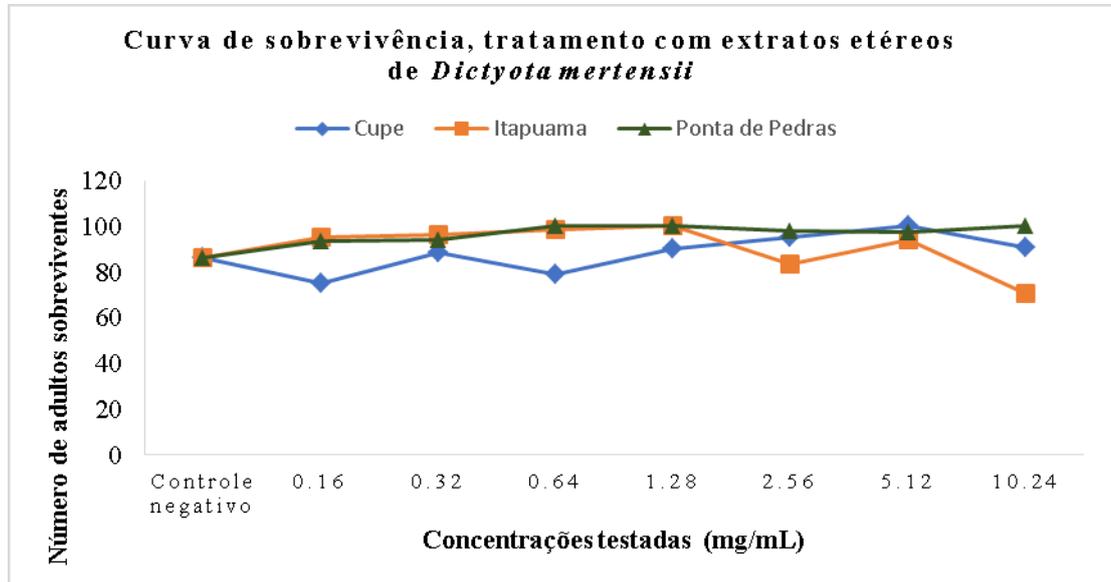
Grupos	Controle	1	5	2	1
	negativo	0.24	.12	.56	.28
Controle		0	0	0	0
negativo		.000*	.000*	.000*	.000*
10.24	0.000*		1	1	1
5.12	0.000*	0	.000	.000	.000
2.56	0.000*	.909	0	1	1
1.28	0.000*	.582	.000	.000	.000
		.234	.000	.000	

* Diferença significativa ($P < 0.05$).
Fonte: A autora.

5.6 Avaliação Da Mutagenicidade

A curva de sobrevivência do teste SMART (Figura 18) foi criada para se determinar a concentração mínima letal. Entre as praias, Cupe apresentou uma variação maior no número de sobreviventes. No entanto, pode-se observar que o extrato etéreo não apresentou toxicidade significativa para indivíduos adultos de *D. melanogaster* nas condições experimentais testadas.

Figura 15 - Número de adultos sobreviventes de *D. melanogaster*, após exposição ao extrato etéreo de *Dictyota mertensii*.

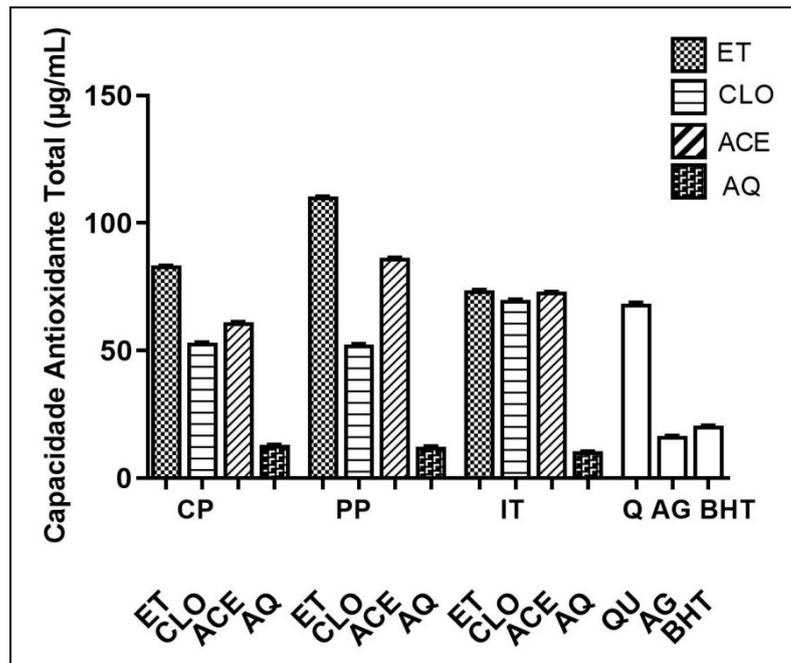
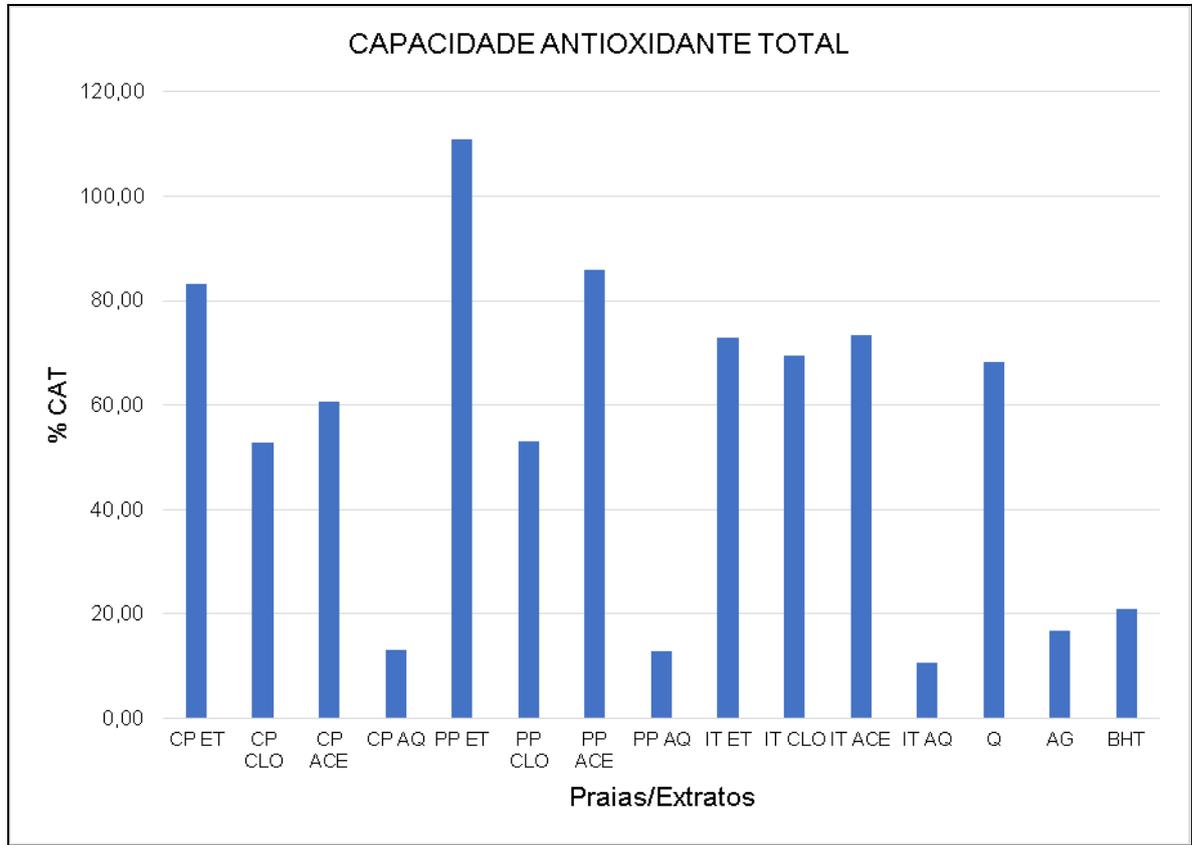


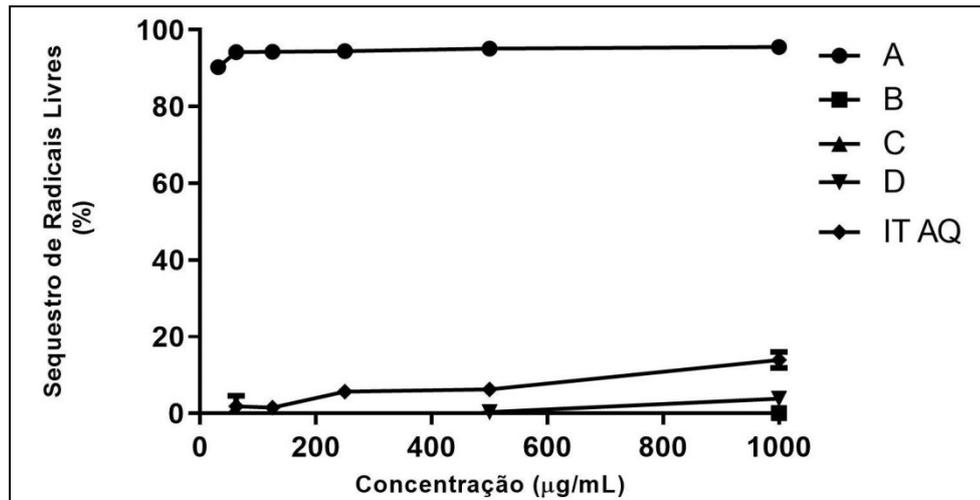
Fonte: A autora.

5.7 Atividade Antioxidante

O teste antioxidante foi realizado com o intuito de se investigar quais dos extratos possuíam uma atividade relevante na captura de radicais livres e indiretamente se verificar em qual alga eventualmente haveria uma maior agressão, ou seja aquela em que o sistema de proteção antioxidante estaria mais ativado. Foram analisados todos os extratos das três praias (Figura 22). Dos extratos testados o aquoso apresentou uma menor atividade, os extratos, etéreo, clorofórmico e acetônico apresentaram resultados acima dos padrões quercetina, ácido ascórbico e BHT, quando se compara os resultados entre as praias, Pontas de Pedra apresenta um resultado superior aos demais, como a referida praia também apresentou um baixo índice e frequência de dano avaliando a genotoxicidade, pode-se inferir que tal extrato apresenta um alto poder antígenotóxico, considerando a baixa citotoxicidade em células tumorais, principalmente quando se compara ao extrato algal da praia do Cupe.

Figura 16 - Taxa de captura de radicais livres por extratos, CP (Cupe), PP (Ponta de Pedras), IT (Itapuama), ET (Extrato Etéreo), CLO (Extrato Clorofórmico), ACE (Acetônico), AQ (Aquoso), Q (Quercetina), AG (Acido Gálico), BHT.





Fonte: A autora

Esse fato pode explicar os resultados obtidos no DPPH, por Pontas de Pedras que apresentar uma alta concentração de Fenol,4,6-di(1,1-dimetiletil)-2-metil na CG-MS, sendo o produto majoritário com 54,6% em sua composição química.

Os resultados do antioxidante podem estar relacionados ainda ao nível de estresse ambiental sofrido pela alga, tais como; alta luminosidade e salinidade, ação antrópica e predação (FREITAS *et al.*, 2007). Esses fatores implicam na produção de metabolitos, os quais respondem ao estímulo do meio, se área apresenta um alto ataque por herbívoro, à alga começa a produzir metabolitos que afugentem os predadores, foi o caso de Itapuama, e Pontas de Pedras.

6 CONCLUSÕES

A metodologia de extração utilizada mostrou-se adequada.

A análise em CG/MS apresentou uma composição diversa nos extratos de *D. mertensii* em praias distintas. Vallim *et al.*, (2005) retrata a variação na concentração de metabolitos, e menciona que tais variações podem ocorrer devido a alterações no meio, por exemplo a ação antrópica, ou alta taxa de herbivoria.

A citotoxicidade é um reflexo da composição química dos extratos, Cupe obteve uma alta taxa de inibição no crescimento de células tumorais, seguido por Ponta de Pedras, e Itapuama. Possivelmente este resultado pode estar relacionado à maior variedade de componentes. As diferentes composições químicas podem estar relacionadas à herbivoria, Alves (2011) e Teixeira (2013), mencionam esta hipótese para este grupo de algas. Entretanto, não foi possível se relacionar esta composição a uma possível ação antrópica.

A genotoxicidade segue o mesmo padrão do teste citotóxico, nela Cupe apresenta uma taxa de índice e frequência de danos maior que o grupo controle, nas concentrações maiores. Os extratos etéreos das demais praias apresentam resultados dose dependente, quanto menor a concentração menor o dano, esses dados mostram que *D. mertensii*, tem um alto poder antígenotóxico.

O DPPH revela que os extratos da praia de Ponta de Pedras apresentaram uma ótima ação antioxidante. Tais resultados podem estar relacionados aos níveis de estresse ambiental que esses organismos sofrem.

REFERENCIAS

ALBERTS, B. *et al.* **Biologia molecular da célula**. São Paulo: Artmed, 2010.

ACIOLE, E.E.P. **Efeito tóxico-genético dos larvicidas dilapiol e espinosade em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2012. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Programa de pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2012.

ÁGUILA-RAMÍREZ, R. N. *et al.* Antimicrobial and antifouling activities achieved by extracts of seaweeds from Gulf of California, Mexico. **Hidrobiológica**, Cidade do México, v. 22, n. 1, p. 8-15, 2017.

ALARADO, A. B.; GERWICK, W. H. Dictyol H, a new tricyclic diterpenoid from the brown seaweed *Dictyota dentata*. **Journal of Natural Products**, Washington, v. 48, n. 1, p. 132-134, 1985.

ALIANÇA, A. S.S. *et al.* The in vitro biological activity of the Brazilian brown seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 19, n. 9, p. 14052-14065, 2014.

ALMEIDA, N. T. V. C. **Triagem de moléculas inibitórias da peroxirredoxina II humana, visando o tratamento da leucemia linfóide aguda (LLA)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Aquática) - UNESPE, São Paulo, 2017.

ALVES, C. **Avaliação da capacidade citotóxica de macroalgas da costa de Peniche (Portugal) em células tumorais humanas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos) - Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar, Instituto Politécnico de Leiria, Leiria, Portugal, 2011.

ALVES, G. L. N. **Avaliação da atividade biológica do polissacarídeo sulfatado fucana B, extraído da alga marinha *Spatoglossum schröderi*, em modelo de melanoma murino in vitro**. 2016. Trabalho de Conclusão de Curso II (Graduação) – Bacharelado em Biomedicina, UFPR, Curitiba, 2016.

AMORIM, A. M. P. B. **Estudo de antioxidantes, potencial bioativo e composição química de *Chnoospora minima*, *Dictyopteris plagiogramma*, *Padina gymnospora*, *Sargassum cymosum* (Ochrophyta) e *Codium isthmocladum* (Chlorophyta)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018. doi:10.11606/D.41.2019.tde-18022019-091636.

AMORIM, E. M. **Estudo da mutagenicidade de metabólitos secundários liquênicos, utilizando o teste smart e ensaio cometa em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2016. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Programa de pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Vitória de Santo Antão, 2016.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.

ANDREGUETTI, D. X. **Prospecção de bioativos farmacológicos em algas marinhas Rhodophyta e Heterokontophyta e avaliação de citotoxicidade**. 2015. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo, 2015.
doi:10.11606/T.9.2015.tde-19112015-102536.

ARAUJO, J. M. **Variação interpopulacional de produtos naturais e sequências moleculares na alga parda *Canistrocarpus cervicornis***. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

ARAÚJO, T. L. **Fucanas extraídas da alga *Dictyota menstrualis* com atividade antioxidante, antiproliferativa e anticoagulante**. 2018. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2018.

AROKIYARAJ, S. *et al.* Phytochemical analysis and antibacterial activity of *Vitex agnus-castus*. **International Journal of Green Pharmacy (IJGP)**, Mandsaur, Índia, v. 3, n. 2, 2009.

ASHBURNER, M.; GOLIC, K.G.; HAWLEY, R.S. **Drosophila: a laboratory handbook**. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2005.

BALBOA, E.M. *et al.* In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae. **Food Chemistry**, Barking, Inglaterra, v. 13, p. 1764-1785, 2013.

BARBOSA, B. S. *et al.* Histórico do desenvolvimento do cultivo de células animais. Uma Revisão. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Fortaleza, v. 9, n. 2, p. 334-347, 2015.

BARBOSA, J. P. *et al.* In vitro antiviral diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota paffii*. **Planta medica**, Stuttgart, Alemanha, v. 70, n. 09, p. 856-860, 2004.

BARACHO, B. M. *et al.* Bioprospecção de produtos naturais de algas marinhas pardas com potencial antioxidante. **Encontros Universitários da UFC**, Fortaleza, v. 1, n. 1, p. 944, 2017.

BARROS, F. C. N.; **Caracterização estrutural e propriedades antitumorais dos polissacarídeos extraídos da alga marinha vermelha *Gracilaria caudata* J Agardh**. 2011. 138 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011

BARROS, M. G. A.; *et al.* **Investigação química da alga parda *Dictyota mertensii* de ilhas oceânicas brasileiras**. 2018. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2018.

BEULA, J. M.; RAVIKUMAR, S.; ALI, M.; Syed. Mosquito larvicidal efficacy of seaweed extracts against dengue vector of *Aedes aegypti*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, Singapura, v. 1, n. 2, p. S143-S146, 2011.

BEZERRA, F. L. **Atividade antiviral de extratos brutos, ricos em polissacarídeos sulfatados, obtidos de macroalgas marrons e verdes contra o vírus dengue 2**. 2016. 135f. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2016.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-30, 1999.

BORBÓN, H. *et al.* Antimicrobial activity of most abundant marine macroalgae of the Caribbean coast of Costa Rica. **Journal of Asian Scientific Research**, Rahim Yar Khan, Paquistão, v. 2, n. 5, p. 292, 2012.

BRAND-WILLIAMS, W; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Uso de um método radical livre para avaliar a atividade antioxidante. **Lwt-Food Science and Technology**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CABRAL, I. S. R. *et al.* Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante e antimicrobiano. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 29, n. 2, 2011.

CALDAS, C. Vida, morte e imortalidade: desvendando a história das células HeLa. **Cienc. Cult.** São Paulo, v. 62 n. 2, 2010.

CÂMARA, R. B. G.; **Atividades anticoagulante e antioxidante de extratos brutos ricos em polissacarídeos sulfatados das macroalgas marinhas marrons *Canistrocarpus cervicornis*, *Dictyota mertensii* e *Dictyopteris delicatula* e de Heterofucanas de *Canistrocarpus cervicornis***. 2010. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2010.

CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do polo ceramista da cidade de Santa Gertrudes-SP**. 2010. 187 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) -Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, Rio Claro, 2010.

CAVALCANTI, D. N. *et al.* Variability of a diterpene with potential antiHIV activity isolated from the Brazilian brown alga *Dictyota menstrualis*. **Journal of applied phycology**, [s, l.], v. 23, n. 5, p. 873-876, 2011.

CLEMENTINO, L. C. **Leishmanioses e a busca de metabólitos secundários de origem marinha: uma abordagem química e biológica**. 2017. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2017.

COLLINS, A., *et al.* The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation research/reviews in mutation research**, Amsterdam, v. 759, p. 27-39, 2014.

COSTA, Leandro Silva. **Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga vermelha *Gracilaria caudata***. 2008. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

COSTA-LOTUFO, L.V. *et al.* A Contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no laboratório nacional de oncologia experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista virtual de Química**, Niterói, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRISPINO, L.M.B. **Feofíceas do litoral do Estado do Espírito Santo**. 2000. 193 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, Rio Claro, 2000.

COELHO, Liliane Da Silva. **Acción moduladora de la genotoxicidad de la planta medicinal *Duguetia furfuracea* (St. Hil) Benth. & Hook f. en células somáticas y germinativas de *Drosophila melanogaster* y en cepas de *Salmonella typhimurium***. 2016. Tese (Doutorado) - Universidad de León, León, Espanha, 2016.

DANTAS, L. A. **Síntese verde de nanopartículas contendo prata e uma fração da Alga *Spatoglossum schröderi* composta por ácido algínico e fucana A: caracterização físico-química e avaliação da atividade antiproliferativa frente às células de melanoma (B16F10)**. 2017. 94f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017.

DE ALMEIDA, V. F. Importância dos costões rochosos nos ecossistemas costeiros. **Cadernos de ecologia aquática**, Rio Grande, RS, v. 3, n. 2, p. 19-32, 2008.

DE CLERCK, O. *et al.* A revised classification of the Dictyoteae (Dictyotales, Phaeophyceae) based on rbcL and 26S ribosomal DNA sequence analyses. **Journal of phycology**, Moss Landing, CA, USA, v. 42, n. 6, p. 1271-1288, 2006.

DE SANTANA, S. L. *et al.* *Drosophila melanogaster* as model organism for monitoring and analyzing genotoxicity associated with city air pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 25, n. 32, p. 32409-32417, 2018.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: changes in the tetrazolium dye procedure, providing greater sensitivity and reliability. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 271-277, 1986.

DHAMODHARAN, P. *et al.* Computational investigation of marine bioactive compounds against E6 oncoprotein of Human Papilloma VirusHPV16. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Gwalior, Índia, v. 8, n. 04, p. 023- 032, 2018.

DRUMOND, R. R. **Análise da ação antitumoral e de parâmetros fisiológicos e toxicológicos em modelos experimentais após o tratamento com uma fração**

de *Mimosa Caesalpinifolia Benth.* 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Piauí, Terezina, 2017.

DUARTE, G. K. G. *et al.*; Avaliação Da Atividade Citotóxica Em Linhagem De Células Tumerais De Extrato Das Folhas De *Esenbeckia Pumila Pohl.* In: CONGRESSO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO DA UEG (CEPE), 4., 2017, Anápolis, GO. **Anais** [...] Anápolis, GO: UEG, 2017.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. *et al.* Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

DURÁN, R. *et al.* New diterpenoids from the alga *Dictyota dichotoma*. **Tetrahedron**, [s. l.], v. 53, n. 25, p. 8675-8688, 1997.

EVANS, L. V.; HOLLIGAN, M. S. Correlated light and electron microscope studies on brown algae I. Localization of alginic acid and sulphated polysaccharides in *Dictyota*. **New Phytologist**, [s. l.], v. 71, n. 6, p. 1161-1172, 1972.

FAULKNER, D. J. Marine natural products. **Natural product reports**, [s. l.], v. 18, n. 1, p. 1R-49R, 2001.

FERNANDES, N. de P. *Dictyota mertensii*: investigação química e farmacológica de seus extratos. 2018. 73 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Bacharelado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2018.

FLEURY, B. G. *et al.* Os Esteróis Das Macroalgas Pardas Marinhas (Classe Pheophyceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 19, n. 1, p. 37-42, 1996.

FOLKMAN, J. *et al.* Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. **Nature**, London, v. 339, p. 58-61, 1989. Doi: 10.1038 / 339058a0 1989. 28.

FREI, H. *et al.* The genotoxicity of the anti-cancer drug mitoxantrone in somatic and germ cells of *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, Amsterdam, v.279, p.21-33.,1992.

FREITAS, O. D. S. **Perfil químico e ação defensiva comparativa de extratos brutos de diferentes localidades do litoral brasileiro da alga parda marinha *Dictyota mertensii* (DICTYOTALES, PHAEOPHYTA).** 2006. 229 f. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

FREITAS, O. S. P. *et al.* Chemical variation in the diterpenes from the Brazilian brown alga *Dictyota mertensii* (Dictyotaceae, Phaeophyta). **Natural Product Communications**, [s. l.], v. 2, n. 1, , 2007.

GERAN, R.I. *et al.* Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [s.l.], n. 3, p 1-103. 1972.

GOMES, D. L. *et al.* Methanolic extracts from brown seaweeds *Dictyota cilliolata* and *Dictyota menstrualis* induce apoptosis in human cervical adenocarcinoma HeLa cells. **Molecules**, Basel, Switzerland, v. 20, n. 4, p. 6573-6591, 2015.

GRAF, U. I. *et al.* Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental mutagenesis**, New York, v. 6, n. 2, p. 153-188, 1984.

GRESSLER, V. **Composição química e potencial biológico das algas vermelhas marinhas *Laurencia filiformis*, *Laurencia intricata*, *Plocamium brasiliense* e *Ochtodes secundiramea* da costa brasileira**. 2010. Tese (Doutorado em Toxicologia e Análises Toxicológicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010. doi:10.11606/T.9.2010.tde-15072011-110848.

GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. (Eds.). **AlgaeBase**. Galway: National University of Ireland, 2019. E-book.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology letters**, Amsterdam, v. 90, n. 2-3, p. 183-188, 1997.

HAY, M. E. Marine chemical ecology: what's known and what's next? **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, [s. l.], v. 200, 103-134, 1996.

HUECK, K. HeLas: As células que dominaram o mundo. **Superinteressante**, São Paulo, 2011. Disponível em: <https://super.abril.com.br/ciencia/helas-as-celulas-que-dominaram-o-mundo/>. Acesso em 19 de Agosto de 2019.

KELECOM, A. Marine organisms: an alternative source of potentially valuable natural products. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 99-106, 1991.

KOTZE, M.; ELOFF, J.N. Extraction of antibacterial compounds from *Combretum microphyllum* (Combretaceae). **S. Afr. J. Bot.** Cidade do Cabo, África do Sul, v. 68, p. 62-67, 2002.

LOPES, T. F. S.; **Efeito mutagênico de extratos foliares de *Spondias monbim*× *Spondias tuberosa* e *turnera subulata***. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde PPGCSA, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2017

KRÜGER, J. V., *et al.* **Avaliação dos efeitos do carotenoide fucoxantina na laminina em células de glioblastoma multiforme humano**. 2018. TCC (Graduação em Biologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Florianópolis, 2018.

LIMA, J. A. **Análise toxicológica in vitro e in vivo de uma fucana antitrombótica da alga marrom *Spatoglossum schdöederi***. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYEYASU, H. **Oncologia para a Graduação**. 3. ed. Marina, São Paulo: Edited by L.-L. e E., 2013.

LOPES, F. G., *et al.* **Estudo dos efeitos antitumorais do carotenóide fucoxantina em células de glioblastoma humano**. 2018. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2018.

LORENZO, Y. *et al.* The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. **Mutagenesis**, Swansea, UK, v. 28, n. 4, p. 427-432, 2013.

LOURENÇO, S.O.; MARQUES JUNIOR, N.A.; Produção primária marinha In: Pereira RC, Soares-Gomes A. Biologia Marinha. **Interciência**, Rio de Janeiro, p. 111-154. 2009.

MACHADOS, F.L.S. *et al.* Atividade biológica de metabólitos secundários de algas marinhas do gênero *Laurencia*. **Revista Brasileira Farmacognosia**, Curitiba, v. 20, n. 3, p. 441-452, 2010.

MAES, J. 10 fatos surpreendentes sobre as células imortais de Henrietta Lacks. **Hypescience**, [s. l.], 2016. Disponível em: <https://hypescience.com/10-fatos-sobre-as-celulas-imortais-de-henrietta-lacks/>. Acesso em: 19 de Agosto de 2019.

MAGWOOD, S.; GEORGE, S. In vitro alternatives to whole animal testing: Comparative cytotoxicity studies of divalent metals in established cell lines derived from tropical and temperate water fish species in a neutral red assay. **Marine Environmental Research**, [s. l.], v. 42, n. 1-4, p. 37-40, 1996.

MATTA, C. B.B. *et al.* Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, Basel, Switzerland, v. 9, n. 3, p. 307-318, 2011. Doi 10.3390/md9030307.

MANZO, E. *et al.* Diterpene content of the alga *Dictyota ciliolata* from a Moroccan lagoon. **Phytochemistry Letters**, Bari, Itália, v. 2, n. 4, p. 211-215, 2009.

MCCLANAHAN T.R.; COKOS, B.; SALA, E. Algal growth and species composition under experimental control of herbivory, phosphorus and coral abundance in Glovers Reef, Belize. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford, v. 44, p. 441- 451, 2002.

MICHALAK, I.; CHOJNACKA, K. Algae as production systems of bioactive compounds. **Engineering in Life Sciences**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 160-176, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: application in proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NASCIMENTO, L. G.; **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade microbiológica de algas marinhas do gênero sargassum**. 2015. Trabalho de

Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

NEGREIROS, M. M. F. **Nanopartículas de prata contendo polissacarídeos sulfatados de algas**: caracterização química, morfológica 30 e identificação de suas atividades antioxidante, bactericida, antiproliferativa e imunomodulatória. 2015. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

NEWMAN, D.; CRAGG, G. Marine-sourced anti-cancer and cancer pain control agents in clinical and late preclinical development. **Marine drugs**, Basel, Switzerland, v. 12, n. 1, p. 255-278, 2014.

NUNES, J.M.C.; *et al.* Algas marinhas bentônicas do município de Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Botanica Malacitana**, Málaga, n. 24, p 5-12, 1999.

ORTIZ-RAMÍREZ, F. A. *et al.* Effects of the secondary metabolites from *Canistrocarpus cervicornis* (Dictyotales, Phaeophyceae) on fertilization and early development of the sea urchin *Lytechinus variegatus*. **Latin American Journal of Aquatic Research**, Valparaíso, v. 41, n. 2, 2017.

PALUMBO, M. O. *et al.* Systemic cancer therapy: Achievements and challenges that lie ahead. **Frontiers in Pharmacology**, [Lausanne], n. 4, p. 1-9, may 2013. doi: 10.3389/fphar.2013.00057.

PEDRINI, A. de G. **Macroalgas (Ocrófitas multicelulares) marinhas do Brasil**. Rio de Janeiro: Technical Books, 2013. (Série flora marinha do Brasil, v. 3).

PEREIRA, H. S. *et al.* Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). **Antiviral research**, Amsterdam, v. 64, n. 1, p. 69-76, 2004.

PEREIRA, L. **Guia ilustrado das Macroalgas**. Coimbra: Coimbra University Press, 2009.

PERES, J.C.F. *et al.* Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. **Ciênc. agrotec.** Lavras, v. 36, n. 3, p.294-299, 2012.

PHILIPPUS, A. C. **Investigação química de extratos de algas pardas do atlântico sul brasileiro**. 2016. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2016.

PINHEIRO-VIEIRA, F.; CALAND-NORONHA, M. C.; Atividade antibiótica de algumas algas marinhas bentônicas do nordeste brasileiro. **Arquivos de Ciências do Mar. Univ. Fed. Ceará**, Fortaleza, v. 11, p.91-93. 1971.

PINHEIRO, A.D.N. *et al.* Diterpenes from the brown alga *Dictyota mertensii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v 86, p.1-3, 2019.

PINTO, Angelo C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, São Paulo, p. 45-61, 2002.

PITOMBO, L.F., TEIXEIRA, V.L.; KELECOM, A. Feromônios Sexuais De Algas Pardas - Uma Visão Quimiossistemática. **Ínsula**, Florianópolis, v. 19, p. 229-248, 1989.

RABANAL, M. *et al.* The system of fucoidans from the brown seaweed *Dictyota dichotoma*: chemical analysis and antiviral activity. **Carbohydrate Polymers**, Barking, UK, v. 101, p. 804-811, 2014.

ROCHA, F. D. *et al.* Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, p. 631-639, 2007.

ROBERTS, D.B. **Drosophila: A Practical Approach**. 2. Ed. Oxford: Oxford University Press, 1998.

ROBERTS, D. B. *Drosophila melanogaster*: the model organism. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [s. l.], v. 121, p. 93–103, 2006. doi: 10.1111 / j.1570-8703.2006.00474.x

RODRIGUES, F. A. R. *et al.* Mefloquine-oxazolidine derivatives: a new class of anticancer agents. **Chem Biol Drug Des.**, Oxford, v. 83, p. 126-131, 2014

ROGERO, S. O. *et al.* Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SAMPAIO, L. R. *et al.* **Avaliação das atividades angiogênica/antiangiogênica, genotóxica/antigenotóxica do óleo de cártamo (Carthamus Tinctorius)**. 2017. Dissertação (Mestrado em Genética) - Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Genética, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, 2017.

SANTOS JR, A.R.; WADA, M.L.F. Diferenciação celular. *In*: _____. **A célula**. São Paulo: Manole, 2005.

SANTOS, R.; SANTOS, R.; MARISCO, G. Avaliação da atividade genotóxica, citotóxica e antimicrobiana da infusão das folhas de *Spondias purpurea* L. **Scientia Plena**, [Aracajú], v. 13, n. 3, 2017.

SCHERER, W. F.; SYVERTON, J. T.; GEY, G. O. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses: IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 97, n. 5, p. 695-710, 1953.

SCHMITT, T. M.; LINDQUIST, N.; HAY, M. E. Seaweed secondary metabolites as antifoulants: effects of *Dictyota* spp. diterpenes on survivorship, settlement, and development of marine invertebrate larvae. **Chemoecology**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 125-131, 1998.

SILVA, E. M. F. *et al.* Estudo in vitro do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies**, Araraquara, SP, v. 36, n. 2, 2015.

SILVA, E.J. **Avaliação dos efeitos genotóxicos de agrotóxicos: risco ocupacional e alimentar**. 2012. 53 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Vitória de Santo Antão, 2012.

SIMAS, D.L.R. *et al.* Diterpenes from the brown seaweed *Dictyota caribaea* (dictyotaceae, phaeophyceae): The ecological and taxonomic significance. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v. 52, p. 33-37, 2014.

SINGH, M. J. Studies on the Antimicrobial Potency of the Marine Algae *Gracilaria corticata* var *corticata* and *Dictyota dichotoma*. **LS-An International Journal of Life Sciences**, Nova Deli, p. 124, 2014.

SOARES, A. R. *et al.* Variation on diterpene production by the Brazilian alga *Styopodium zonale* (Dictyotales, Phaeophyta). **Biochemical systematics and ecology**, [s. l.], v. 31, n. 11, p. 1347-1350, 2003.

SOARES, D. C. *et al.* Dolabelladienetriol, a compound from *Dictyota pfaffii* algae, inhibits the infection by *Leishmania amazonensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. e1787, 2012.

SOUSA, M. J. B. *et al.* Avaliação do Potencial Genotóxico e Mutagênico de Extratos Padronizados de *Caesalpinia ferrea* (jucá) e *Brosimum gaudichaudii* (inharé). **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, Canoas, RS, p. 69-75, 2011.

STEIN, E. M. **Avaliação das atividades biológicas e composição química dos extratos de algas vermelhas do gênero Laurencia (Rhodomelaceae, Ceramiales) do litoral do Espírito Santo, Brasil**. 2011. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. doi:10.11606/D.41.2011.tde-21092011-155134.

STEPHENS, P. R. S. *et al.* Diterpene from marine brown alga *Dictyota friabilis* as a potential microbicide against HIV-1 in tissue explants. **Journal of Applied Phycology**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 775-780, 2017.

STEPHENSON, R.; METCALFE, N.H. *Drosophila melanogaster*: a fly through its history and current use. **J Roy Coll Phys Edinburg**, Edinburgh, v. 43, p. 70-5, 2013.

SUBRAMANIAN, U. *et al.* Marine Algal Secondary Metabolites Promising Anti-Angiogenesis Factor against Retinal Neovascularization in CAM Model. **Research & Reviews: A Journal of Life Sciences**, Noida, Índia, v. 8, n. 1, p. 19-25, 2018.

SULEIMAN, M. M. *et al.* Detection of antimicrobial compounds by bioautography of different extracts of leaves of selected South African tree species. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, Osun, Nigéria, v. 7, n. 1, 2010.

SZECHY, M.T.M., DE PAULA, J.C. **Phaeophyceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015.

TEIXEIRA, V.L. Produtos Naturais de Algas Marinhas Bentônicas. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 5, n. 3, p 343-362, 2013.

TEIXEIRA, V. L.; TOMASSINI, T.; KELECOM, A. Cervicol, a Further Secodolastane Diterpene from the Marine Brown Alga *Dictyota Cervicornis* kützing (Phaeophyceae, Dictyotaceae). **Bulletin Des Sociétés Chimiques Belges**, [s. l.], v. 95, n. 4, p. 263–268, 2010. doi:10.1002/bscb.19860950406

TICE, R. R. *et al.* Single cell gel / comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genotoxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, p. 206-221, 2000.

TORRES, P. B. *et al.* Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS•+ em microplaca. **Instituto de Biociências**, São Paulo, 2017.

USOLTSEVA, R. V. *et al.* Structure and anticancer activity of native and modified polysaccharides from brown alga *Dictyota dichotoma*. **Carbohydrate Polymers**, Barking, UK, v. 180, p. 21-28, 2017.

VALLIM, M. A. *et al.* The diterpenes from Dictyotacean marine brown algae in the Tropical Atlantic American Region. **Biochemical Systematics and Ecology**, [s. l.], v.33, p. 1-16, 2005.

VANDERLEI, E. D. S. O. **Atividades antinociceptiva e antiinflamatória da lectina da alga marinha verde *Caulerpa cupressoides* (Vahl) C. Agardh var. *lycopodium* em animais**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/10457>. Acesso em: 02 nov. 16.

VERÇOSA, C. J. *et al.* Validation of Comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. **Ecotoxicology and environmental safety**, Amsterdam, v. 141, p. 148-153, 2017.

VIDOTTI EC, ROLLEMBERG MC Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 139-145, 2004.

YUAN, Y. V.; WALSH, N. A. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. **Food and chemical toxicology**, Exeter, UK, v. 44, n. 7, p. 1144-1150, 2006.

YUNIS, J. J. The chromosomal basis of human neoplasia. **Science**, Washington, v. 221, n. 4607, p. 227-236, 1983.

ZOLFAGHARI, E. R. *et al.* *Drosophila melanogaster*: a model organism for controlling Dipteran vectors and pests. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, Basingstoke, UK, v. 30, n. 3, p. 505-513, 2015.