

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – UFPEL
Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos
Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção – PPGBBio
- UFPel



Tese

**Lipídeos de Macroalgas Antárticas: Análises por Cromatografia Gasosa e
Espectrometria de Massas e estudos preliminares das atividades
antioxidante e antibacteriana**

Ivandra Ignês de Santi

Ivandra Ignês de Santi

Lipídeos de Macroalgas Antárticas: Análises por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas e estudos preliminares das atividades antioxidante e antibacteriana

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira

Co-Orientador: Prof. Dr. Rogério Antonio Freitag

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S235I Santi, Ivandra Ignes de

Lípídeos de Macroalgas Antárticas: Análises por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas e estudos preliminares das atividades antioxidante e antibacteriana / Ivandra Ignes de Santi ; Claudio Martin Pereira de Pereira, orientador ; Rogerio Antonio Freitag, coorientador. — Pelotas, 2020.

144 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Atividade biológica. 2. Esteroides. 3. Ácidos graxos. I. Pereira, Claudio Martin Pereira de, orient. II. Freitag, Rogerio Antonio, coorient. III. Título.

CDD : 543

Ivandra Ignês de Santi

Lipídeos de Macroalgas Antárticas: Análises por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas e estudos preliminares das atividades antioxidante e antibacteriana

Tese aprovada, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 29/12/2020.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira (Presidente)

Doutorado em Química – UFSM

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos- UFPel

Prof^a. Dr^a. Francieli Moro Stefanello

Doutorado em Bioquímica UFRGS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos- UFPel

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

Doutorado em Farmácia – USP

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - UCS

Dr^a Bruna Silveira Pacheco

Doutorado em Biotecnologia – UFPel

PPG- Biotecnologia UFPel



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

DEFESA DE TESE

Aluno	16104515 - IVANDRA IGÑES DE SANTI		
CPF	94672997049	Nacionalidade	BRASILEIRA
Naturalidade			
Ingresso	SELEÇÃO PÓS-GRADUAÇÃO - 2016/1		
Programa	PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO		
Curso	8104 - BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO	Nível	DOUTORADO
Modalidade	PRESENCIAL		

Dados pessoais dos membros da banca examinadora

Nome completo	Documento	Nasc	Titulação		
			Área	Local	Ano
CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA	66734380025	1971	QUÍMICA	UFSM	2004
FRANCIELI MORO STEFANELLO	95954600015	1978	BIOQUÍMICA	UFRGS	2008
BRUNA SILVEIRA PACHECO	023.353.160-28	1990	BIOTECNOLOGIA	UFPEL	2018
SIDNEI MOURA E SILVA	802.383.780-04	1980	FARMÁCIA	USP	2009

Membros da banca examinadora	Titulo	Assinatura
66734380025 - CLAUDIO MARTIN PEREIRA DE PEREIRA	DOUTORADO	
95954600015 - FRANCIELI MORO STEFANELLO	DOUTORADO	
023.353.160-28 - BRUNA SILVEIRA PACHECO	DOUTORADO	
802.383.780-04 - SIDNEI MOURA E SILVA	DOUTORADO	

Ao(s) ____ dia(s) do mês de ____ de ____ os membros acima nomeados para a defesa da TESE do estudante IVANDRA IGÑES DE SANTI matriculado no PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO, consideram **APROVADA** estabelecendo o título definitivo da TESE como sendo: **LÍPIDOS DE MACROALGAS ANTÁRTICAS: ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTROMETRIA DE MASSAS E ESTUDOS PRELIMINARES**, e estabelecendo um prazo máximo de **45** dia(s) para as correções e entrega da versão definitiva.

↳ DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA

Eu, **CLAUDIO M. P. PEREIRA**, atesto que o(s) membro(s) da banca listado(s) acima sem assinatura participou/aram da sessão de forma remota e/ou por parecer.

Presidente da Banca

Pelotas, 29.12.2020



Claudio Pereira de Pereira
Prof. Associado
Bacharelado Química Forense



Claudio Pereira de Pereira
Prof. Associado
Bacharelado Química Forense

Dedico essa tese à meu filhos, Paola e Lorenzo.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus, fonte de luz e expiração.

Agradeço o Prof. Dr. Claudio, Orientador, e ao Co-Orientador Prof. Dr. Rogério, por terem aceito a orientar nessa jornada. Pelo aprendizado e ensinamentos adquiridos nesse período, além disso, agradeço pela disponibilidade de tempo e dedicação a esse trabalho e a ter livre acesso em seus laboratórios.

Aos colegas, Lucas e Dalila, obrigado por me ajudar intensamente e incansavelmente em nossos artigos e também pela amizade construída nesse período.

Aos colegas de laboratório, Leticia (s), Andressa, Andryelle e Igor sempre dispostos a ajudar, pela companhia e amizade.

Agradeço a Marcelle, pelas horas dedicadas às análises, e trocas de conhecimento.

Aos professores, Daiane e Darci, por cederem seus laboratórios para a realização das atividades práticas.

Agradeço imensamente à meus pais, irmãos que sempre me apoiaram em todas as minhas decisões, vocês são meus exemplos de batalhas em tudo que faço.

Meus filhos, Paola e Lorenzo, meus pequenos, sempre juntos mostrando compreensão e ensinando de um jeito meigo e amoroso como adultos, que tudo que se faz se faz com amor, obrigada meus amores.

Ao Darci, grande exemplo de professor, pesquisador, pai e esposo, obrigada por sempre me apoiar e estar junto nessa caminhada, que para mim foi difícil mas cheguei até aqui, obrigada por tudo.

Muito obrigado!

*Se não puder voar, corra.
Se não puder correr, ande.
Se não puder andar, rasteje,
mas continue em frente
de qualquer jeito.*

Martin Luther King

Resumo

SANTI, Ivandra Ignês de. Lipídeos de Macroalgas Antárticas: Análises por Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massas e estudos preliminares das atividades antioxidante e antibacteriana. Orientada pelo Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira. 2020. 144 f. Tese (Doutor em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

A Antártica compreende um reservatório de micro-organismos e macro-organismos, dentre eles, as macroalgas, conhecidas por sua riqueza em compostos fitoquímicos. As macroalgas são consideradas um fonte de esteroides e ácidos graxos, classes de metabolitos envolvidos na fluidez e permeabilidade da membrana. O presente estudo tem por objetivo a extração e quantificação de esteróis de quatro macroalgas vermelhas da Antártica: *Palmaria decipiens*, *Plocamium cartilagineum*, *Iridaea cordata* e *Pyropia endiviifolia*, em que a extração de esteróis envolve hidrólise alcalina da biomassa de algas. A quantificação de colesterol, brassicasterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol e fucosterol foi realizada por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). Avaliou-se também o perfil de lipídeos por meio de análises cromatográficas e espectroscópicas de cinco macroalgas da Antártica, *Adenocystis utricularis*, *Desmarestia confervoides*, *Curdiea racovitzae*, *Myriogramme manginii* e *Ulva intestinales* bem como avaliou-se também as atividades antioxidante e antibacteriana. Na quantificação de esteroides, o colesterol foi o composto mais abundante (216,32 a 3195,69 mg kg⁻¹), seguido de β -sitosterol (131,42 a 654,18 mg kg⁻¹), estigmasterol (68,35 a 393,20 mg kg⁻¹), brassicasterol (68,56 a 337,43 mg kg⁻¹), campesterol (64,95 a 277,78 mg kg⁻¹) e fucosterol (57,67 a 286,18 mg kg⁻¹). O brassicasterol não foi encontrado em *I. cordata*, mas foi identificado nas outras três amostras. No resultado do perfil de lipídeos das cinco macroalgas e foram identificados 31 componentes compreendendo principalmente em ácidos graxos (48,73 -331,91 mg.Kg⁻¹), esteróis (14,74 - 321,25 mg.kg⁻¹ e álcoois (13,07 - 91,87 mg.kg⁻¹). Além disso, *Desmarestia confervoides* apresentou uma atividade antioxidante de 86,03 % de inibição do radical DPPH a 1 mg.mL⁻¹. A avaliação antibacteriana mostrou que extratos de *Ulva intestinales*, *Curdiea racovitzae* e *Adenocystis utricularis* inibiram o crescimento de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) em concentrações de 1,5 a 6 mg.mL⁻¹. Assim, as macroalgas Antárticas avaliadas neste estudo possuem potencial em compostos químicos que incluem representantes de lipídeos e além disso, apresentam atividades promissoras como agentes antioxidantes e antibacterianos que podem ser aplicadas pelas indústrias farmacêutica, biotecnológica e alimentícia.

Palavras-chave: atividade biológica, esteroides, ácidos graxos, cromatografia

Abstract

SANTI, Ivandra Ignês de. Antarctic Macroalgae Lipids: Analysis by Gas Chromatography and Mass Spectrometry and preliminary studies of antioxidant and antibacterial activities. Supervised by Prof. Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira. 2020. 144 f. Thesis (Doctor of Sciences) - Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting, Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2020

Antarctica comprises a reservoir of microorganisms and macroorganisms, including macroalgae, known for their richness in phytochemicals. Macroalgae are considered a source of steroids and fatty acids, classes of metabolites involved in the fluidity and permeability of the membrane. This study aims to extract and quantify sterols from four red Antarctic macroalgae: *Palmaria decipiens*, *Plocamium cartilagineum*, *Iridaea cordata* and *Pyropia endiviifolia*, in which the extraction of sterols involves alkaline hydrolysis of algae biomass. The quantification of cholesterol, brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and fucosterol was performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). The lipid profile was also evaluated using chromatographic and spectroscopic analyzes of five Antarctic macroalgae, *Adenocystis utricularis*, *Desmarestia confervoides*, *Curdiea racovitzae*, *Myriogramme manginii* and *Ulva intestinales*, as well as antioxidant and antibacterial activities. In the quantification of steroids, cholesterol was the most abundant compound (216.32 to 3195.69 mg kg⁻¹), followed by β -sitosterol (131.42 to 654.18 mg kg⁻¹), stigmasterol (68.35 to 393.20 mg kg⁻¹), brassicasterol (68.56 to 337.43 mg kg⁻¹), campesterol (64.95 to 277.78 mg kg⁻¹) and fucosterol (57.67 to 286.18 mg kg⁻¹). Brassicasterol was not found in *I. cordata*, but was identified in the other three samples. As a result of the lipid profile of the five macroalgae, 31 components were identified, comprising mainly fatty acids (48.73 - 331.91 mg.kg⁻¹), sterols (14.74 - 321.25 mg.kg⁻¹ and alcohols) (13.07 - 91.87 mg.kg⁻¹). In addition, *Desmarestia confervoides* showed an antioxidant activity of 86.03% inhibition of the DPPH radical at 1 mg.mL⁻¹. The antibacterial evaluation showed that extracts *Ulva intestinales*, *Curdiea racovitzae* and *Adenocystis utricularis* inhibited the growth of *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) in concentrations of 1.5 to 6 mg.mL⁻¹. evaluated in this study have potential in chemical compounds that include representatives of lipids and, in addition, have promising activities as antioxidant and antibacterial agents that can be applied by the pharmaceutical, biotechnological and food industries..

Key- words: biological activity, steroids, fatty acids, chromatography

Figura 1	Mapa do Continente Antártico	20
Figura 2	Exemplos de Macroalgas Parda, Vermelha e Verde	22
Figura 3	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários	23
Figura 4	Principais fatores que influenciam no acúmulo de metabólitos secundários	24
Figura 5	Exemplos de: Ácido graxos saturado (ácido estearico); Ácido graxo monoinsaturados (ácido oleico); Ácidos graxos polinsaturados (ácido linoleico).	25
Figura 6	Estrutura básica dos esteroides	28
Figura 7	Exemplos de esteroides encontrados em macroalgas	29
Figura 8	Representação da Estrutura Química de um Ácido Graxo	32
Figura 9	Representação esquemática de possíveis alvos e mecanismos celulares de ação antibacteriana de ácidos graxos livres (AGLs)	36
Figura 10	Mecanismos de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio.	37
Figura 11	Exemplo de Cromatografia de papel	40
Figura 12	Exemplo de Cromatografia de Camada Delgada	40

Lista de Tabelas

Tabela 1	Teores relativos de esteróis da literatura em macroalgas vermelhas determinados por GC-MS.	123
Tabela 2	Teores relativos de esteróis da literatura em macroalgas vermelhas determinados por HPLC	124

Lista de abreviaturas e siglas

DPPH	2,2-Diphenyl-1-picryl-hidrazil
ABTS	Ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DHA	Ácido docosahexaenoico, do inglês <i>Docosahexaenoic acid</i>
DPA	Ácido docosapentaenoico, do inglês <i>Docosapentaenoic acid</i>
EPA	Ácido eicosapentaenoico, do inglês <i>Eicosapentaenoic acid</i>
AGCC	Ácido graxo de cadeia curta
AGDs	Ácido graxos e derivados
ALA	Ácido α -linolênico, do inglês <i>α-linolenic acid</i>
AGs	Ácidos Graxos
MUFAs	Ácidos graxos monoinsaturados, do inglês <i>Monounsaturated Fatty Acid</i>
PUFAs	Ácidos graxos poli-insaturados, do inglês <i>Poli Unsaturated Fatty Acid</i>
ATP	Adenosina trifosfato
CTE	Cadeia de transporte de elétron
Ca	Cálcio
CUPRAC	Capacidade antioxidante da redução do ions férrico, do inglês, <i>cupric ion reducing antioxidante capacity</i>
ORAC	Capacidade de absorção dos radicais oxigenados, do inglês, <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
COV	Compostos orgânicos voláteis
MIC	Concentração Inibitória Mínima, do inglês <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
CCD	Cromatografia de camada delgada
CP	Cromatografia de papel
CG	Cromatografia a gás
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-IR	Cromatografia líquida e alta eficiência acoplada a espectroscopia de infravermelho
CLUE	Cromatografia líquida ultra eficiência
CM	Cromatografia multidimensional

FID	Detecção por Ionização de Chama
AAPH	Dicloro de 2,2-azobis -2-amidinopropano
MS	Espectrometria de Massas, do inglês <i>Mass Spectrometry</i>
P	Fosforo
CO ₂	Gás carbônico
BHA	Hidroxianisol butilado, do inglês <i>Butylated hydroxyanisole</i>
BHA	Hidroxianisol butilado, do inglês, <i>Butylated hydroxyanisole</i>
BHT	Hidroxitolueno butilado, do inglês <i>Butylated hydroxytoluene</i>
BHT	Hidroxitolueno butilado, do inglês <i>Butylated hydroxytoluene</i>
O ₂	Oxigênio
FRAP	Poder antioxidante da redução do ferro, do inglês, <i>Ferric reducing antioxidant power</i>
K	Potássio
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico do inglês, <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
UV	Ultravioleta

Sumário

1 Introdução	15
2 Objetivos	18
2.1 Objetivo geral	18
2.2 Objetivos específicos	18
3 Revisão da Literatura	19
3.1 Antártica	19
3.2 Algas	20
3.3 Metabolismo Secundário	22
3.4 Principais compostos químicos presentes em algas	25
3.5 Esteroides	27
3.6 Valor Nutricional das Algas	30
3.7 Atividade Biológica	31
3.7.1.1 Antimicrobianos	31
3.7.1.2 Ácidos Graxos	32
3.7.1.3 Efeitos antimicrobianos de AGS	33
3.7.1.4 Mecanismo de ação dos AGs	35
3.7.2 Atividade Antioxidante	36
3.8 Cromatografia	39
Manuscrito 1	42
Manuscrito 2	75
4 Discussão dos Manuscritos	117
5 Conclusões e Perspectivas	132
6 Referências Bibliográficas	133

1 Introdução

As algas marinhas, também conhecidas como macroalgas, são classificadas de acordo com sua pigmentação, aspectos bioquímicos e morfológicos compreendendo Rhodophyta (algas vermelha), Ochrophyta (algas pardas ou marrons) e Chlorophyta (algas verdes) (SILVA et al., 2013; DAPPER et al., 2014; OUCIF et al., 2020). As macroalgas que vivem na Antártica, devido as adversidades climáticas são induzidas a produzir metabólitos secundários como mecanismos de sobrevivência. Dentre esses destacam-se os ácidos graxos (saturados e poli-insaturados), carboidratos, terpenoides, polifenóis, dentre outros. Muitos desses metabólitos encontrados em macroalgas são essenciais para a alimentação humana (ALENCAR et al., 2011; PEREIRA et al., 2012; DE ALMEIDA et al., 2011; OUCIF et al., 2020).

Alguns compostos químicos encontrados em macroalgas e que possuem atividade biológica pertencem à classe dos terpenoides, compostos fenólicos e polissacarídeos sulfatados. Já compostos extraídos das macroalgas como os ficocoloides, que são classificados em ágar, carragenana e alginato, são muito utilizados na manufatura de medicamentos, cosméticos e alimentos (ALENCAR, et al., 2011; PERES, et al., 2012; DAPPER, et al., 2014). Dentro da classe dos terpenos, temos os esteróis, como o colesterol e o desmosterol, encontrados nas macroalgas vermelhas (NASIRI, et al., 2011), que são de grande importância para a indústria farmacêutica.

As macroalgas vem sendo consideradas como alimento, devido a presença de diversos compostos químicos que apresentam benefícios a saúde humana. As proteínas, carboidratos, fibras, micronutrientes e ácidos graxos são alguns exemplos de compostos fitoquímicos que constituem essas macroalgas. Além desses, os esteroides presente nas macroalgas, podendo ser encontrado na forma livre ou como ácidos graxos esterificados ou envolvidos em conjugados glicosilados. Eles são responsáveis por diversas atividades biológicas como antioxidante, antiinflamatória, antimicrobiana, antitumoral e antidiabética (BALBOA et al. 2013, PLAZA et al., 2008; PLAZA, CIFUENTES & IBANEZ, 2008).

O colesterol, fucosterol, sitosterol, campesterol, stigmasterol, ergosterol, brassicasterol, são alguns exemplos de esteroides. A concentração desses

esteroides presentes em macroalgas variam bastante, e está relacionada a diversos fatores como o tipo de alga, local de coleta e ao período de coleta. Por apresentarem propriedades benéficas a saúde humana, alguns esteroides tem-se destacado como o sitosterol, estigmasterol, campesterol, brassicasterol, isofucosterol, que apresentam efeitos redutores na inibição da absorção do colesterol (ALENCAR et al., 2011; SAEIDNIA et al., 2014; KENDEL et al., 2015; PEREIRA et al., 2016). E o β -sitosterol é utilizado para o tratamento do câncer de próstata, e estimula enzimas antioxidantes (SAEIDNIA et al., 2014).

Para a caracterização desses esteroides, tem-se usado técnicas avançadas de isolamento, assim é possível compreender a composição química presente nas algas. A cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização de chama (CG-FID) ou cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massa (CG-MS) são tradicionalmente utilizadas para a análise desses esteroides. Essas análises geralmente são rápidas e possibilitam identificar e quantificar um grande número de compostos químicos simultaneamente (LOPES et al., 2013; PEREIRA et al., 2016). Além dos esteroides, AGs e seus derivados também são analisados pelas mesmas técnicas, fornecendo uma ampla compreensão desses compostos.

Outros compostos que ganharam atenção por prevenir diversas doenças, dentre elas cardiovasculares, neurológicas e diabetes foram os AGs (OUCIF et al., 2020). Além de prevenir várias doenças, eles apresentam diversas propriedades biológicas, dentre elas, atividade antimicrobiana, antioxidantes, antitumorais (OUCIF et al., 2020; PEREIRA et al., 2012; BALBOA et al., 2013; VILLAREAL et al., 2018). Os AGs extraído da macroalga *Adenocystis urticularis* mostrou uma redução na proliferação e induziu a apoptose em células de câncer de mama. E os AGs da *Mazzaella laminarioides* também apresentou redução na proliferação em células de câncer de bexiga (PACHECO et al., 2018; do AMARAL et al., 2020).

O extrato de acetato de etila da *Himantothallus grandifolius* mostrou notável atividade antifúngica contra todos as cepas de fungos do gênero *Cândida*. A atividade antibacteriana de extratos de macroalgas podem estar associados à presença de AGs em sua constituição. Entre os motivos que podem explicar essa atividade estão nas características anfipáticos dessas moléculas que podem

interagir e penetrar nas membranas induzindo danos e permitindo a difusão de outras moléculas que podem afetar ainda mais outros processos como lise celular e diminuição de absorção de nutrientes (MARTINS et al. 2018; PACHECO et al. 2018; CORTÉS et al. 2014).

Além disso, as macroalgas representam uma fonte de substâncias antioxidantes naturais, uma vez que essas, possuem um sistema de antioxidantes bem desenvolvidos, pois esses organismos são submetidos a rápidas variações de intensidade de luz, temperaturas, concentração de O₂ e CO₂ ao longo da plataforma continental (ROCHA, et al., 2007; VILLAREAL-GOMEZ, et al., 2010; SILVA, et al., 2013; RAUTENBERGUER, et al., 2015). Devido à essas atividades, tornam interessante a busca por novos compostos com propriedades antimicrobiana e antioxidante. Apesar da grande diversidade e do potencial das algas, a porcentagem de algas da Antártica estudadas ainda é bastante baixa, uma média de 5%, permitindo assim, uma maior exploração de fonte viáveis na aplicação biológica e alimentar (ANDRADE et al., 2013; BERNEIRA et al., 2020).

Nesse contexto, torna-se importante o estudo de novos compostos químicos presentes em macroalgas da Antártica. Dessa forma, é grande o interesse na caracterização para obter novos compostos químicos com atividades biológicas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterização de compostos químicos de extratos lipofílico extraídos de macroalgas da Antártica, e avaliar a triagem das atividades antioxidante e antibacteriana

2.2 Objetivos específicos

Identificar e quantificar seis esteróis (colesterol, brassicasterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol e fucosterol) de macroalgas vermelhas da Antártica: *Palmaria decipiens*, *Plocamium cartilagineum*, *Iridaea cordata* e *Pyropia endiviifolia*.

Analisar os compostos químicos presentes em extratos lipofílico de macroalgas Antárticas (*Adenocystis utricularis*, *Desmarestia confervoides*, *Curdiea racovitzae*, *Myriogramme manginii*, e *Ulva intestinales*).

Determinar a atividade antioxidante dos cinco extratos lipofílico das macroalgas da Antártica pelo método DPPH.

Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos lipofílico das macroalgas da Antártica frente à bactérias gram-positivas e gram-negativas.

3 Revisão da Literatura

3.1 Antártica

O Continente Antártico, localizado no polo Sul, é um ambiente que se caracteriza por um extremo no clima, onde seus aspectos biogeográficos e habitats, tornam-se bastante particulares. Variações na temperatura e salinidade, alta incidência de radiação ultravioleta revezado por longos períodos de ausência de luz, mudanças climáticas contínuas e acentuadas, ciclo de congelamento e degelo são variações que influenciam na distribuição de água e consequente alterações no clima (MEDEIROS, 2013; RAUTENBERGUER et al., 2015).

Os organismos que vivem nesse ambiente antártico, se adaptam aos fatores ambientais como, a claridade que no inverno chega a 5 h enquanto que no verão chega a 20 h, bem como a temperaturas do oceano de $-1,8^{\circ}\text{C}$ no inverno à $+2^{\circ}\text{C}$ no verão. Outra alteração que varia de acordo com a época do ano é o pH que varia entre 8,0 e 8,6 e a radiação ultravioleta (UV) que têm aumentado nos últimos anos (SCHOENROCK et al., 2015).

Devido ao seu isolamento geográfico e condições climáticas, o continente antártico, possui um fonte interessante de espécies endêmicas de algas, que permanece relativamente inexplorada de biodiversidade (PEREIRA et al., 2017). Muitas pesquisas vem sendo realizadas nesse continente, na Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (EACF) (Figura 1) localizada na Ilha Rei George, tem uma área de aproximadamente 131 Km^2 , mas a porcentagem de estudo relacionados sobre as algas da Antártica ainda é escasso (MEDEIROS, 2013). Com isso, ainda temos muito a descobrir dos organismos marinhos que vivem nesse local e que possuem um sistema de adaptação ao clima.



Figura 1: Mapa do Continente Antártico <https://www.coladaweb.com/wp-content/uploads/2014/12/antartida-e1427291083951.jpg> .acessado em 21/06/2020.

3.2 Algas

As algas são um grupo heterogêneo e apresentam uma grande diversidade de formas e tamanhos, podendo ser organismos microscópicos unicelulares (microalgas) a multicelulares de grande tamanho (macroalgas), constituindo um total de 25.000 a 30.000 espécies. Elas vivem em habitats complexos submetidos a condições extremas como salinidade, temperatura, nutrientes, irradiações UV. Portanto se adaptam rapidamente a essas mudanças ambientais, produzindo assim uma grande variedade de compostos químicos biologicamente ativos (metabólitos secundários). Além disso, as algas são de fácil cultivo, crescimento rápido (para algumas algas) e a possibilidade de controlar a produção de compostos bioativos de interesse, manipulando as condições de cultivo (PLAZA, CIFUENTES & IBANEZ, 2008). O conhecimento de algumas algas são mais detalhadas, isto é devido ao fácil acesso aos locais de coleta, e outras são mais deficientes devido aos locais de coleta serem mais árduos (PALACIOS et al., 2015).

As algas são divididas em Ochrophyta (algas pardas ou marrons), Rhodophyta (algas vermelhas) e Chlorophyta (algas verdes) (Figura 2) (SILVA et al., 2013; DAPPER et al., 2014). A classificação das algas marinhas, conhecidas popularmente como macroalgas, é baseada em algumas características como a anatomia, pigmentação, morfologia, composição química entre outras (OUCIF et al., 2020).

As algas vermelhas são encontradas em águas tropicais e quentes, porém em regiões mais frias do mundo algumas espécies são encontradas. Existem cerca de 4.000 – 5.000 espécies dessas algas. Podendo se citar as macroalgas antárticas como *Palmaria decipiens*, *Plocamium cartilagineum*, *Iridaea cordata*, *Pyropia endiviifolia*, *Curidea racovitzae* e *Myriogramme manginii*. Polissacarídeos, ágar ou carragenana, amido, carotenoides como o betacaroteno e luteína, pigmento ficoeritrina, são encontrados em algas do filo Rhodophyta. A alga vermelha *Porphyra*, coloração roxo-avermelhado, é muito utilizada em involucrio em sushi em todo mundo, além disso, muitas dessas algas vermelhas contêm compostos farmacêuticos com diversos efeitos, dentre eles a atividade antibacteriana (NAUER & LOPES FILHO, 2017; CHAPMAN, 2013).

As algas verdes (filo Chlorophyta) representam cerca de 6.000 a 8.000 espécies. Apresentam uma grande variação de formas e tamanhos. A *Ulva intestinales* é um exemplo de algas verdes. São encontradas em diversos habitats, aquáticos, terrestres e em associação simbióticas com fungos. Único grupo de organismos fotossintetizantes a possuírem clorofilas. Além disso, carotenoides como a luteína e betacaroteno são encontrados (NAUER & LOPES FILHO, 2017; CHAPMAN, 2013).

Algas pardas ou marrons como a *Adenocystis urticularis* e a *Desmarestia confervoides* pertencentes ao filo Ochrophyta, são mais abundantes em regiões mais frias do globo. As algas marrons podem variar de formas microscópicas a formas macroscópicas de até 60 metros de comprimento. Existem 1.500 a 2.000 espécies ou mais. Nas paredes celulares são encontradas o ácido algínico um polissacarídeo comercialmente importante na indústria alimentícia e farmacêutica, a celulose, os carotenoides como betacaroteno e grandes quantidades de fucoxantina, além da violoxantina (NAUER & LOPES FILHO, 2017; CHAPMAN, 2013).



Figura 2: Exemplos de Macroalgas Parda (*Sargassum* sp), Vermelha (*Chlamydomonas nivalis*) e Verde (*Ulva intestinalis*). acessado em 21/06/2020. <https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fwww.paversul.com.br>

Nas últimas décadas tem aumentado a descoberta de novos compostos químicos extraídos de organismos marinhos com atividade biológica antitumoral, antiviral, antimicrobiana, inseticida, citotóxico e ações fitotóxicas (RAUTENBERGUER et al., 2015). Alguns estudos sugerem que algumas macroalgas apresentam uma nova e ilimitada fonte de ingredientes alimentares funcionais. Além disso, as algas representam uma fonte de substâncias antioxidantes naturais, uma vez que, possuem um sistema antioxidante bem desenvolvido, pois esses organismos estão sendo sempre submetidos a rápidas variações de intensidade de luz, temperaturas, concentração de oxigênio (O₂) e gás carbônico (CO₂) ao longo da plataforma continental (ROCHA et al., 2007; VILLAREAL-GOMEZ et al., 2010; PLAZA et al., 2010; PERES et al., 2012; SILVA et al., 2013; RAUTENBERGUER et al., 2015).

3.3 Metabolismo Secundário

As plantas produzem metabólitos primários e secundários que incluem uma ampla função fisiológica. Os metabólitos primários como aminoácidos, açúcares simples, ácidos nucleicos e lipídeos são responsáveis pelos processos vitais do desenvolvimento das plantas. Já os metabólitos secundários são produzidos em resposta a um estresse, em defesa contra parasitas ou predadores. A origem dos metabólitos secundários podem ser resumidos a partir do metabolismo da glicose (metabolito primário), via dos intermediários do ácido chiquímico e da

acetilcolinesterase (Acetil-CoA), conforme representado na Figura 3 (SIMÕES, et al., 2010).



Figura 3: Ciclo biossintético dos metabolitos secundários. Fonte: SIMOES et al., 2010.

A biodiversidade terrestre oferece um grande arsenal de produtos naturais a serem explorados, no entanto a farmacognosia marinha também tem sua importância, visto que a mesma vem construindo sua própria linha de pesquisa. A variedade biológica marinha apresenta um grande número de espécies e essas ocupam um espaço geográfico aquático de cerca de 70% do Planeta, dentre esses estão as algas (SIMOES et al., 2010).

O interesse em produtos naturais marinhos se deu a partir de descobertas de compostos químicos de fontes marinhas, como exemplo a azidovudina (AZT), um importante recurso quimioterápico disponível ao combate do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (MONTES, 2012). Algumas características produzidas em ambientes marinhos são resultados do habitat em que elas vivem, que diferem muito do ambiente terrestre. Visto que, nesses ambientes há íons importantes, como o sulfato, o cloreto, o brometo, e o iodeto. Com isso, é evidenciado a presença de compostos halogenados e sulfatados presentes nesses organismos marinhos, o que diferencia das plantas terrestres (DE CARVALHO & ROQUE, 2000).

As algas vermelhas são responsáveis por sintetizar metabolitos halogenados de grande diversidade, pertencentes em diversas classes como, hidrocarbonetos de baixo peso molecular, cetonas, fenóis, acetogeninas e terpenos. Além disso, elas são eficientes na produção de polissacarídeos sulfatados, carragenana e o ágar. Diferente das algas marrons e verdes, que produzem menos compostos químicos halogenados e as algas marrons apresentam polissacarídeos sulfatados (DE CARVALHO & ROQUE, 2000).

Assim como as plantas que apresentam uma grande variedade de compostos químicos, as macroalgas também apresentam uma variação de compostos químicos. Esses podem estar relacionadas a diversos fatores ambientais (Figura 4) como habitat, luz, poluição, genética, localização e sazonalidade, maturidade, estação de coleta, salinidade, disponibilidade de nutrientes. Outros fatores que apresentam relação na composição química das algas são os métodos aplicados na extração desses compostos químicos e no método utilizado para a sua identificação (PEREIRA et al., 2012; OUCIF et al., 2020).

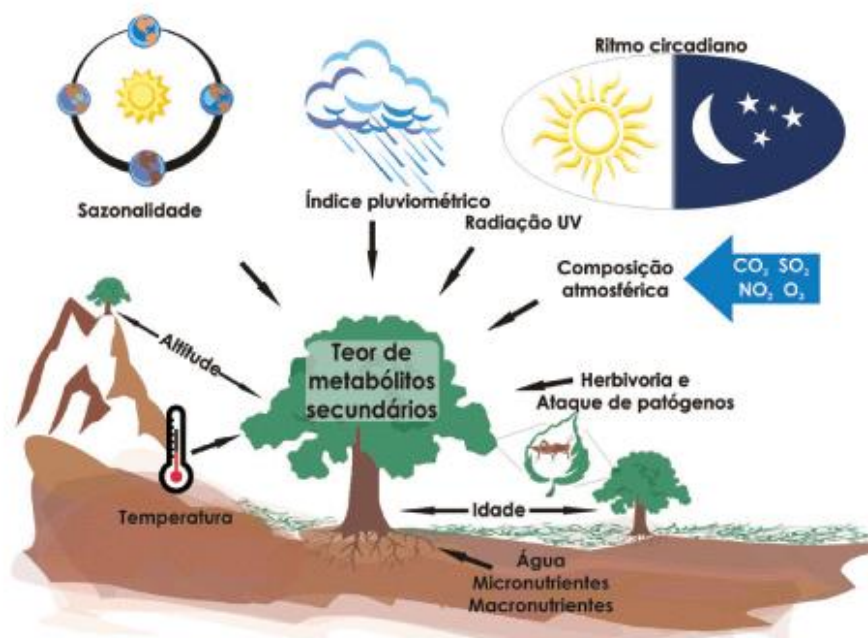


Figura 4: Principais fatores que influenciam no diversificação de metabólitos secundários (Gobbo-Neto, L., & Lopes, N. P. 2007).

3.4 Principais Compostos Químicos presentes em algas

As algas marinhas tem despertado o interesse devido a diversidade de seus compostos químicos. Exemplos desses, temos as proteínas, carboidratos, fibras, micronutrientes e ácidos graxos (Figura 5) ALENCAR et al., 2011; PEREIRA et al., 2012). Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFAs) apresentam maior proporção em algas do que em plantas terrestres. Os PUFAs são moléculas anfipáticas que possuem funções biológicas essenciais, como manutenção da fluidez da membrana e permeabilidade da membrana celular (OUCIF et al., 2020). Elas também ganharam atenção especial devido ao seu desempenho na saúde humana, na prevenção de várias doenças, dentre elas, cardiovasculares, osteoartrite e diabetes. Além disso, propriedades benéficas tem sido atribuídas aos PUFAs, como antimicrobianas, antivirais, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais (PEREIRA et al., 2012; BALBOA et al., 2013; PEREIRA et al., 2012; VILLAREAL et al., 2018).

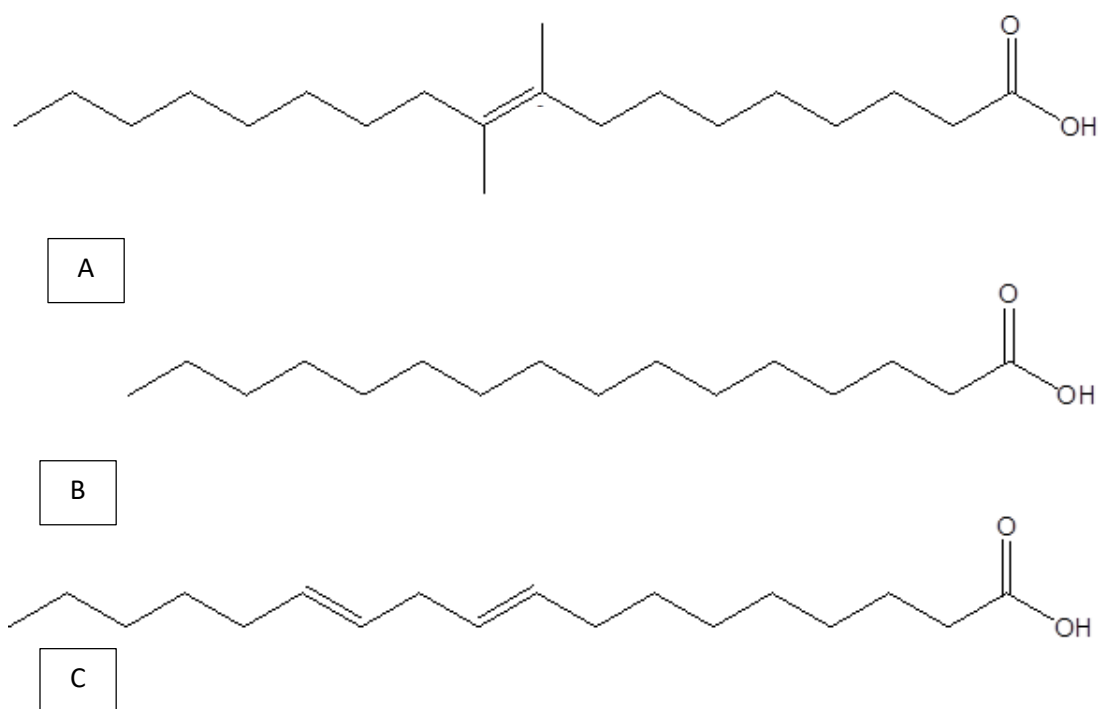


Figura 5: Exemplos de Ácido graxos (A) Ácido Elaidico; (B) Ácido Palmitico e (C) Ácido Linoleico.

AGs essenciais como ácido docosahexaenóico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido α -linolênico (ALA) e ácido docosapentaenóico (DPA) que são ácidos vitais para a nutrição humana, encontrados em

macroalgas. O EPA e o DHA são responsáveis pela redução de doenças cardíacas, redução do colesterol e hipertensão (SANTOS et al., 2017). Plaza, Cifuentes & Ibanez (2008) também demonstraram que o EPA (C20: 5 ω 3) exerce efeito na redução de doenças coronárias, trombose e arteriosclerose.

Outro estudo recente realizado por Pacheco e colaboradores (2018) mostrou que os ácidos graxos monossaturados (MUFAs) e PUFA, extraídos da macroalga da antártica *Adenocystis urticularis*, tem um potencial na redução da proliferação e induz a apoptose em células de câncer de mama. Amaral et al., (2020) utilizou AGs extraídos da macroalga *Mazzaella laminarioides*, em que apresentou um potencial para a redução da proliferação em células de câncer de bexiga.

Além dos compostos químicos citados anteriormente, os compostos orgânicos voláteis (COV) também estão entre os metabolitos secundários produzidas pelas macroalgas. Esses apresentam atividade antimicrobiana e antincrustantes (PAUL & POHNERT, 2011). Berneira e colaboradores (2020) analisaram o perfil dos COV em macroalgas da antártica, revelando a presença de aldeídos, hidrocarbonetos, cetonas, álcoois e derivados de furano. O Hexanal e benzaldeído, por exemplo, são compostos químicos utilizados pela indústria. Outro exemplo são os aldeídos, que confere atividade antimicrobiana, importante aplicação biológica. As cetonas, como a 2-heptanona, por exemplo, é utilizada como aditivo em alimentos de consumo humano (de ALENCAR et al., 2017).

Outra classe de compostos químicos encontrados nas algas são os polissacarídeos. Esses apresentam uma enorme variação estrutural e são responsáveis por apresentar atividade protetora. Também possuem importantes aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica e biotecnológica, exemplos desses polissacarídeos temos o ágar, carragenana, fucoïdanas e o alginato (DAPPER et al., 2014; PEREIRA et al., 2012).

O ágar que é extraído de muitas algas vermelhas é empregado na fabricação de gomas, laxantes ou como meio de cultura para bactérias, além disso são extraídos a carragenana. Essa utilizada pela indústria farmacêutica como anticoagulante e anti-inflamatório. Na indústria de alimentos o polissacarídeo (carragenana) é utilizado na fabricação de alimentos como iogurte, sorvete e achocolatados (VIDOTTI & ROLEMBERG, 2004).

Os polissacarídeos das algas marrons (Phaeophyta) mostraram eficácia no controle de doenças de plantas. Exemplo desse, o polissacarídeo laminarina, isolado de *Laminaria digitata* é eficaz na defesa contra hospedeiros em plantas. O extrato da alga *Ascophyllum nodosum* estimula a atividade de peroxidases e síntese de fitoalexinas resultando em maior resistência (NASIRI et al., 2011; PERES et al., 2012).

Outros compostos presente nas algas e que também possuem atividade biológica pertence à classe dos terpenos, compostos fenólicos e polissacarídeos sulfatados. As algas vermelhas se destacam por ser o maior produtor de compostos halogenados, seguidos pelas verdes e marrons. Exemplos importantes de compostos químicos bioativos como, terpenos halogenados é o laurenditerpenol, isolado de *Laurencia intricata*, que inibe o processo de angiogênese. O composto químico 7-etil desoxiparguerol, isolado de *Jania rubens*, apresentou atividade anti-helmíntica e demonstrou ser eficaz contra carcinoma. Dentro da classe dos terpenos, temos os esteróides, como o colesterol e o desmosterol, encontrados nas algas vermelhas, que são de grande importância para a indústria farmacêutica (PERES et al., 2012; DAPPER et al., 2014).

Em relação as algas verdes, foram encontrados poucos estudos relacionado, porém, o extrato da alga *Ulva fasciata* apresentou redução no número de colônias em pó mofo (mofo comum em plantas de feijão) (PERES et al., 2012). Além das diversas aplicações das algas, elas também são utilizadas na agricultura como bioestimulantes e fertilizantes naturais (DAPPER et al., 2014).

3.5 Esteroides

Os esteroides (Figura 6) são lipídeos essenciais presente na maioria das células eucarióticas, que tem importantes funções na fluidez da membrana celular, auxiliando como mensageiro secundário de sinalização do desenvolvimento. O colesterol, estigmasterol e o ergosterol são os principais esteróis presentes em vertebrados, plantas e fungos (VILLARELA et al., 2018). As algas apresentam uma fonte interessante de esteróis, esses desempenham um papel importante na regulação das membranas celulares (LOPES et al.,

2011; PEREIRA et al., 2017). Na terapêutica, os esteróis tem diferentes atividades biológicas que incluem atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antidiabético e anticâncer (LEE et al., 2003).

A variabilidade de esteróis em algas é bastante diversificada (Figura 7). As algas marrons apresentam o colesterol e o fucosterol, como os principais esteroides. Nas algas vermelhas e verdes geralmente são encontradas o colesterol e seus derivados (PAYGHAMI et al., 2015; BOUZIDI et al., 2008).

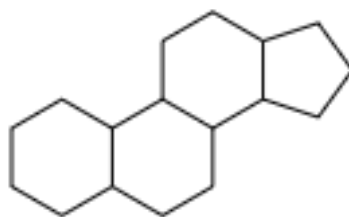


Figura 6: Estrutura básica dos esteroides.

Pereira e colaboradores (2017), quantificou os esteroides de diferentes algas marrons (*Adenocystis utricularis*, *Ascoseira mirabilis*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia antarctica* e *Himantothallus grandifolius*), coletadas na antártica, onde o fucosterol foi o mais abundante (*A. utricularis* 48,13 mg kg⁻¹) seguido pelo β -sitosterol (*A. mirabilis* 16,49 mg kg⁻¹). O fucosterol encontrado nas algas apresenta efeitos benéficos, incluindo inibição da absorção de colesterol, anticancerígeno, antioxidante, ações antidiabéticas, anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas e antiulcerativa (LEE et al., 2003; PLAZA et al., 2008).

O sitosterol possui várias atividades biológicas, dentre elas anti-inflamatória, analgésica, quimioprotetora, anti-helmínticas, hipocolesterolêmicas. Já o estigmasterol tem sido frequentemente relatado pela sua ação hipocolesterolêmica, anti-inflamatória, propriedades antiperoxidativas, e hipoglicêmicas (SAEIDNIA et al., 2014). Enquanto que o β -sitosterol, presente na composição de medicamentos alguns fitoterápicos, é utilizado em tratamento hiperplasia prostática benigna. Além disso, ele estimula enzimas antioxidantes, e é eficaz como agente antidiabético, neuroprotetor e quimioprotetor (PAYGHAMI et al., 2015).

O ergosterol é importante economicamente, pois é um precursor da vitamina D₂, tem potencial para o desenvolvimento de drogas anticâncer, visto que inibe o crescimento de diferentes linhas celulares de câncer *in vitro* (VILLARELA et al., 2018).

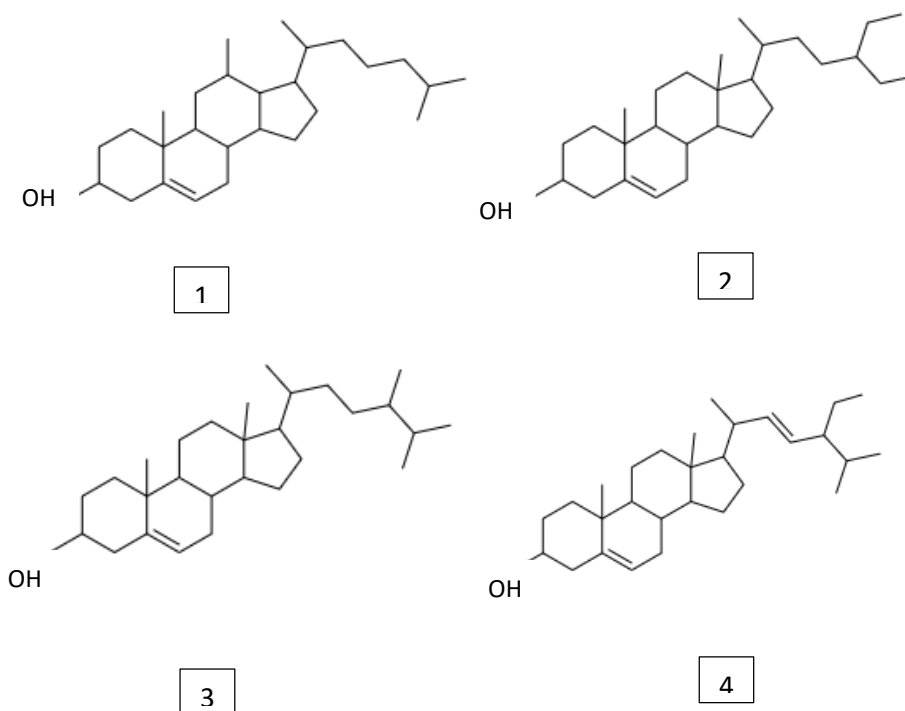


Figura 7: Exemplos de esteroides encontrados em macroalgas (1) Colesterol, (2) Sitosterol, (3) Campesterol, (4) Stigmasterol.

Outros esteróis como campesterol, brassicasterol, isofucosterol, são conhecidos por exibirem também efeitos redutores de colesterol, diminuindo a absorção intestinal de colesterol (KENDEL et al., 2015). Além disso, a atividade dos fitoesteróis em doenças cardiovasculares e suas potentes propriedades anti-inflamatórias também foram relatadas (PATCH et al., 2006). Além de proporcionar efeitos benéficos na redução do colesterol do sangue, os fitoesteróis tem ações antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, antidiabéticas e antitumoral (BALBOA et al. 2013, PLAZA et al., 2008; PLAZA, CIFUENTES & IBANEZ 2008).

3.6 Valor Nutricional das Algas

O consumo de algas marinhas pelos humanos está documentada pela data de 600 a.C., incluindo os países como China, Japão, Coréia e Filipinas. O hábito de consumir algas marinhas é devido a presença de proteínas, carboidratos, fibras dietéticas, carotenoides além de micronutrientes e ácidos graxos essenciais que constituem as algas. Elementos esses, essenciais para a função fisiológica do corpo humano (ALENCAR et al., 2011; PEREIRA et al., 2012). As algas vermelhas e verdes, são ricas em carboidratos enquanto que as algas marrons são abundantes em iodo e fibras solúveis. Além disso, as algas marinhas são ricas em vitaminas A, B1, B12, C, D e E, em minerais como Cálcio (Ca), Fósforo (P) e Potássio (K) (OUCIF et al., 2020).

Os AGs essenciais (refere-se aos nutrientes necessários para processos biológicos que não podem ser sintetizados pelo corpo humano, e deve ser obtido por fontes externas) devem ser ingeridos na dieta, incluindo ácidos graxos n-3 e n-6. Esses atuam modulando os processos inflamatórios e autoimunes como no tratamento do câncer, asma, psoríase, artrite reumatoide, doença inflamatória intestinal, depressão, alergias, e doenças cardiovasculares (PEREIRA et al., 2012; BALBOA et al., 2013). Além dessas atividades associadas aos ácidos graxos ômega-3 (n3), incluem, efeitos antibacterianos, antioxidantes e tem destaque como nutracêuticos (BERNEIRA et al., 2020).

Os AGs também ganharam atenção especial devido ao seu papel na saúde humana, na prevenção de várias doenças, dentre elas, cardiovasculares, osteoartrite e diabetes. Além disso, propriedades benéficas tem sido atribuídas aos PUFAs, como antimicrobianas, antivirais, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais (OUCIF et al., 2020; PEREIRA et al., 2012; BALBOA et al., 2013; PEREIRA et al., 2012; VILLAREAL et al., 2018).

AGs essenciais como DHA, EPA, ALA e DPA que são ácidos vitais para a nutrição do ser humano, onde o EPA e o DHA são responsáveis por reduzir os riscos de doenças cardíacas, redução do colesterol e hipertensão. Além disso, o EPA (C20: 5 ω 3) exerce efeito na redução de doenças coronárias, trombose e arteriosclerose (SANTOS et al., 2017; PLAZA, CIFUENTES & IBANEZ, 2008).

Outros AGs considerados essenciais foram encontrados em algas, são os mesmos encontrados no leite humano, esses são responsáveis por funções

importantes no desenvolvimento mental e visual de uma criança (BALBOA et al., 2013).

3.7 Atividade Biológica

3.7.1.1 Antimicrobianos

Em 1928, Alexander Fleming descobriu acidentalmente a primeira substância antimicrobiana (penicilina) no laboratório em que trabalhava, por consequência de uma placa de Petri contaminada com mofo, o qual matou as bactérias que estavam em estudo. Em 12 anos, Fleming e outros pesquisadores, transformaram essa descoberta em um medicamento potente para a sua época, que poderia curar pacientes com infecções bacterianas. Outros antimicrobianos também foram descobertos, tornando-se um dos maiores avanços médicos do século XX, nas quais doenças mortais como a pneumonia e tuberculose eram tratadas (YAO & ROCK, 2017; O'NEILL, 2014).

Entretanto, o estímulo na busca de novos antibióticos se deu a partir da demonstração dos efeitos terapêuticos da penicilina G, assim, a estreptomicina, cefalosporina C, eritromicina, tetraciclina, entre outros antibióticos naturais, isolados de fungos ou bactérias, esses descobertos por pesquisas subsequentes, durante 20 anos. Avanços na biologia estrutural e química medicinal permitiram que pesquisadores modificassem quimicamente os produtos naturais para produzir antibióticos semissintéticos com propriedades clínicas mais eficazes. A maioria desses antibióticos são utilizados atualmente, incluindo os β -lactâmicos, tetraciclina e macrolídeos (YAO & ROCK, 2017).

Entretanto, se observou entre os anos de 1968 e 2000 um longo período sem descoberta de novos fármacos antimicrobianos. Assim, na atualidade o avanço da resistência bacteriana representa um problema de saúde pública, pois, se espalha mais rápido que o desenvolvimento de novos fármacos na prática clínica (ABDALLAH, 2011; CRF-SP, 2011; SAVOIA et al., 2012).

Essas resistências aos medicamentos antimicrobianos encontra-se em todos os países onde pacientes com doenças como a tuberculose, malária e vírus da imunodeficiência humana (HIV), expressa resistência aos antimicrobianos de escolha. Alguns fatores como, automedicação, falsificação dos antimicrobianos, disponibilidade e uso indiscriminado, são responsáveis pela

resistência. Viagens internacionais abrem uma nova oportunidade para patógenos resistentes a antimicrobianos serem difundidos globalmente, tornando-os mais resistentes ao compartilhar seu material genético, criando assim novas cepas resistentes (O'NEILL, 2014; CALDAS-ARIAS, 2015).

Já infecções causadas por biofilmes são de difícil eliminação, pois são mais resistentes aos antimicrobianos que as bactérias formadoras de biofilmes. Testes *in vitro* mostram que a sobrevivência é maior dessas bactérias após o tratamento com antimicrobiano, e a taxa de mutação também é elevada, tornando-as resistentes. Essa resistência está relacionada com a proximidade de organismos microbianos dentro do biofilme e a abundância de ácido desoxirribonucleico (DNA) (DNA exógeno) que facilita a transferência de genes e a aquisição e propagação de determinantes de resistência (CALDAS-ARIAS, 2015).

3.7.1.2 Ácidos graxos

Os AGs constituem-se de uma cadeia de átomos de carbono ligada a átomos de hidrogênio, e o número de átomos de carbono variam do tamanho da cadeia. Em uma extremidade da cadeia de carbono existe um grupo carboxila ($-\text{COOH}$) e, no outro extremo, um grupo metila ($-\text{CH}_3$) (Figura 8). O grupo carboxila é hidrofílico, e o carbono da cadeia é hidrofóbica, o que torna a molécula anfipática (DESBOIS, & SMITH, 2010).

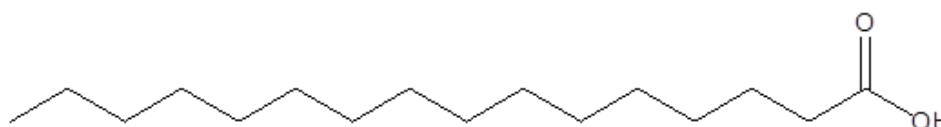


Figura 8: Representação da Estrutura Química de um Ácido Graxo.

Os AGs são provenientes de uma extensa fonte como algas, animais e plantas, e desempenham um papel importante como substâncias nutritivas, capacidade de defesa contra potenciais oportunistas e micro-organismos patogênicos (LIMA, et al., 2011; DAVOODBASHA, et al., 2017). Além disso, são considerados quando em baixas concentrações, como tendo pouca ou nenhuma toxicidade, e isso tem atraído muito a atenção da comunidade científica nos

últimos 40 anos, de modo que eles têm sido testados quanto a sua atividade antimicrobiana (ZANGH, et al., 2012).

A produção de AGs a partir de várias fontes, se torna importante devido a sua ampla aplicação como matéria-prima tanto na indústria de alimentos, cosméticos, farmacêutica (KHORAMNIA et al., 2013), sendo esses AGs frequentemente identificados como componentes de medicamentos éticos e fitoterápicos comercializados (DESBOIS, & SMITH, 2010).

3.7.1.3 Efeitos antimicrobianos de AGs

Muitos AGs são descritos na literatura pelos seus efeitos antimicrobianos contra microrganismos oportunistas e patogênicos, além de outras atividades como antifúngicos e antioxidantes (LIMA, et al., 2012; DAVOODBASHA, et al., 2017) e essas atividades podem ter influência devido suas propriedades estruturais, tais como comprimento da cadeia de carbono, insaturação, localização das instaurações, esterificação e grupos funcionais (KABARA, 1984; ZHANG, et al., 2012).

Os efeitos antimicrobianos do ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) contra bactérias, fungos e vírus, foram estudados. O ácido láurico e seus derivados, são eficazes agentes antimicrobianos em alimentos e cosméticos (KHORAMNIA et al., 2013).

Em estudos realizados por Butt et al., (2018) com microemulsões à base de AGs no combate à oftalmia neonatal causada por *Neisseria gonorrhoeae* e *Staphylococcus aureus*, os autores observaram que essas microemulsões exerceram efeitos antimicrobianos frente as bactérias. Esse estudo sugeriu que o ácido linolênico pode ser usado na terapia eficaz e estável para o tratamento da oftalmia neonatal causadas pelas bactérias causadoras da oftalmia.

Ácidos Graxos e derivados (AGDs) foram testados contra *Staphylococcus aureus*. Nesse estudo foi aplicado a MIC de todos os AGDs contra *S. aureus* e o resultados apresentado em $-\log_{10} \text{MIC}$. Entre os AGDs, os monoglicerídeos de ácidos graxos mostraram atividades mais potentes ($3,968 - \log_{10} \text{MIC}$), as atividades médias de AGs e álcoois graxos foram 2,644 e 2,602 respectivamente. Os compostos com $-\log_{10} \text{MIC} \geq 3.500$ (com potente atividade antimicrobiana) eram monoglicerídeos de AGs com um comprimento de 10–14

carbonos ou AGs insaturados com comprimento de cadeia superior a 18 carbonos. O ácido linolênico foi o AG mais potente, e monotridecanoína foi o monoglicerídeo mais potente (ZHANG, et al., 2012).

Já Nobmann et al., (2009) investigaram a eficácia antimicrobiana de AGs saturados e carboidratos derivados de AGs contra uma variedade de bactérias patogênicas e deteriorantes focadas em *Listéria monocytogenes*. A eficácia antimicrobiana dos compostos sintetizados foi comparada com compostos comercialmente disponíveis, tais como monolaurina e monocaprilina, bem como os AGs livres, ácido láurico e ácido caprílico, que têm comprovada atividade antimicrobiana. Entre os derivados de carboidratos sintetizados, éter láurico de metil α -D-glucopiranosídeo e éster láurico de metil- α -D-manopiranosídeo apresentaram o maior efeito inibitório do crescimento com valores de MIC de 0,04 mM, comparável à monolaurina. Os carboidratos derivados de AGs foram mais ativos contra bactérias gram positivas do que bactérias gram negativas, sendo esses derivados com grande potencial para o desenvolvimento de agentes antibacterianos para a indústria de alimentos, particularmente para o controle de *Listeria* ou outros patógenos gram positivos.

Shanmughapriya, e colaboradores (2008) realizaram um estudo com extratos (metanol: tolueno) de quatorze algas marinhas coletadas na Índia, onde foram testadas contra dez patógenos humanos. Destes, sete espécies foram determinadas como altamente bioativas e selecionadas para os patógenos multirresistentes. *Stocheospermum marginatum* foi a única alga marinha que mostrou atividade contra *Klebsiella pneumoniae*. O extrato de *Gracilaria corticata* foi altamente ativo contra *Proteus mirabilis*.

Estudos realizados por Davoodbasha et al., (2017) com éster metílico de AGs rico em C16 (extraído da microalga *Scenedesmus intermedius*), realizaram testes contra bactérias gram positivas, gram negativas e fungos (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus mutans*; *Candida albicans* e *Aspergillus parasiticus*). Os resultados foram evidenciados pela zona de inibição onde a maior atividade apresentada foi contra bactérias gram positivas em relação às gram negativas.). Ésteres metílicos de AGs, exibem forte atividade antibacteriana quando comparados a lipídios ou AGs livres. Esse é um comportamento influenciado

pela modificação de espécies de carbonila nos AGs. Essas modificações foram efetuadas através do processo de transesterificação, que produz álcoois polihídricos que podem aumentar sua atividade biológica.

Devido a isso, pesquisas estão sendo realizadas na busca de novos compostos químicos com atividade antimicrobianas onde extratos de macroalgas podem ser uma promessa para essa atividade. Esse estímulo na busca de novos antibióticos se deu a partir da demonstração dos efeitos terapêuticos da penicilina G, assim, a estreptomicina, cefalosporina C, eritromicina, tetraciclina, entre outros antibióticos naturais, isolados de fungos ou bactérias, foram descobertas por pesquisas subsequentes, durante 20 anos. Avanços na biologia estrutural e química medicinal permitiram que pesquisadores modificassem quimicamente os produtos naturais para produzir antibióticos semissintéticos com propriedades clínicas mais eficazes (YAO e ROCK, 2017).

3.7.1.4 Mecanismo de ação de AGs

O mecanismo de ação antimicrobiano dos AGs ainda não está exatamente esclarecido, mas o principal alvo parece ser a membrana celular bacteriana (Figura 9). Sabe-se que AGs matam ou inibem o crescimento de bactérias ao romper a membrana celular interferindo na cadeia de transporte de elétrons (CTE) e no rompimento da fosforilação oxidativa. A CTE, localizada na membrana interna da bactéria, é fonte essencial de energia para a bactéria. O rompimento dessa é causado por ligação direta de AGs aos portadores de elétrons ou por inserção com a membrana interna, prejudicando a capacidade da CTE de transferir elétrons. Isso resulta em redução do gradiente de prótons, potencial de membrana e da produção de adenosina trifosfato (ATP) impedindo o crescimento e/ou desenvolvimento da bactéria (DESBOIS & SMITH, 2010; BUTT et al., 2018).

AGs também podem inibir o crescimento bacteriano por lise celular, inibição da atividade enzimática, diminuição da absorção de nutrientes e geração de produtos de peroxidação e auto oxidação (BUTT et al., 2018).

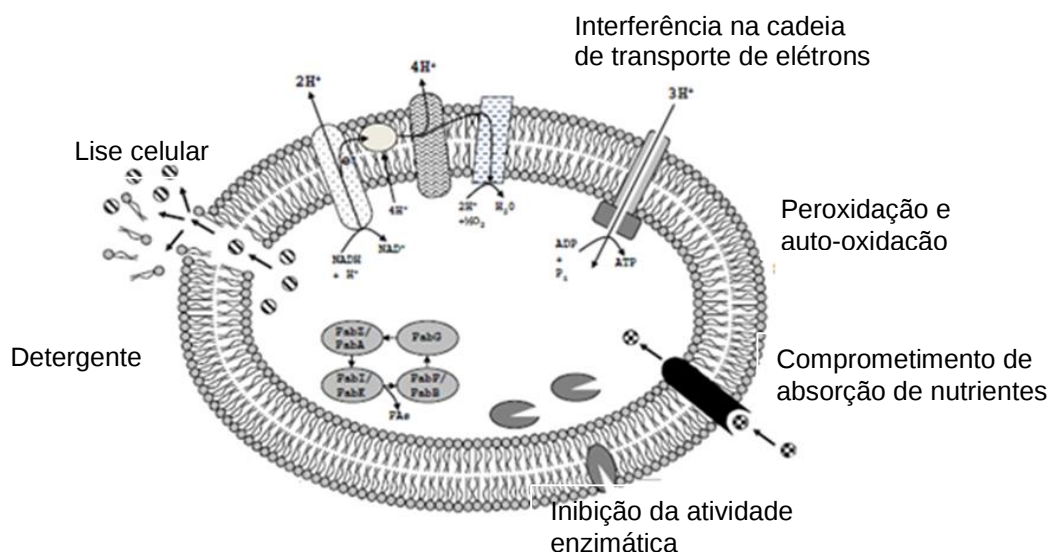


Figura 9: Representação esquemática de possíveis alvos e mecanismos celulares de ação antibacteriana de ácidos graxos livres. Desbois, & Smith (2010).

A eficácia dos AGs de cadeia mais curta sobre o ácido graxo de cadeia média pode ser atribuído às diferenças na estrutura da membrana externa e a permeabilidade entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, uma vez ligando-se à membrana podem alterar o mecanismo celular (ZHANG, et al., 2012). AGs podem agir na bactéria diretamente por ação bactericida, ou inibir seu crescimento (ação bacteriostática), que é reversível e significa que a bactéria permanece viável, mas não pode sofrer divisão celular na presença dos AGL (BUTT et al., 2018).

3.7.2 Atividade Antioxidante

Diferentes ensaios químicos *in vitro* tem sido utilizados para determinar a capacidade antioxidante de produtos naturais, incluindo o ORAC (captura do radical peroxila), captura do radical orgânico (DPPH, ABTS), capacidade de redução de ferro (FRAP; CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno) e o mais recente ensaio baseado em nanotecnologia, que utiliza nanossondas para avaliar a capacidade de redução de metal de antioxidantes (LOPEZ-ALARCOM & DENICOLA, 2013; FRANKEL e MEYER, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; ARUOMA, 2003). Dentre esses métodos o ORAC, DPPH, ABTS e FRAP são

alguns métodos mais utilizados atualmente (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA CALIXTO, 2006).

O método DPPH (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) é baseado na captura do radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. A cor inicial violeta-escura passa a cor violeta-clara a amarelada (Figura 10). O método DPPH é considerado altamente sensível, fácil e preciso (OLIVEIRA, 2015).

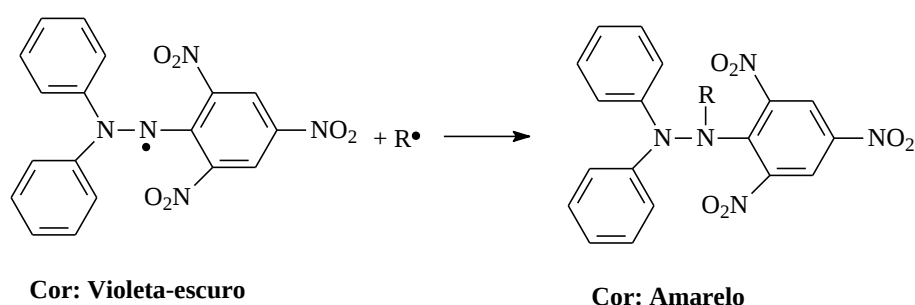


Figura 10: Mecanismos de reação entre o radical DPPH• e um antioxidante através da transferência de um átomo de hidrogênio. Fonte: OLIVEIRA, 2015.

Devido ao aumento da limitação à utilização de antioxidantes sintéticos como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) que podem implicar em muitos riscos para a saúde, busca-se novas fontes de antioxidantes obtidos a partir de fontes naturais. Várias estratégias tem sido adotadas para a descoberta de novas substâncias químicas bioativos para o desenvolvimento de novos compostos provenientes de fontes naturais alternativas (MOHDALY, et al., 2010).

Nas algas marinhas a presença da atividade antioxidante pode estar associada a diversos fatores, dentre esses, está a variabilidade do clima, que induz as mesmas a biossintetizar metabolitos secundários que atuam como mecanismos químicos de defesa, tal como ocorre em plantas terrestres. Esses responsáveis pela sua defesa e sobrevivência. Por essa razão, esses organismos podem apresentar uma fonte importante de substancias químicas com atividade antioxidante, tanto para a indústria farmacêutica como de alimentos. Exemplos desses constituintes temos os compostos fenólicos, carboidratos, ácidos graxos e esteroides. AGs como por exemplo o ácido α -

linolênico que apresenta importante atividade antioxidante (BERNEIRA et al., 2020; PLAZA, CIFUENTES & IBANEZ, 2008; IKEDA et al., 2003).

Em algas marrons, o α -tocoferol é altamente estável ao calor e aos ácidos e instável ao álcalis, radiação UV e oxigênio, ele fixa os radicais livres devido a presença de um grupo fenol em sua estrutura. Já os carotenoides apresentam uma alta atividade antioxidante devido à sua grande variedade estrutural, exemplo desses temos o xantofilas, que demonstrou atividade contra doenças cerebrovasculares (PLAZA, CIFUENTES & IBANEZ, 2008; IKEDA et al., 2003). Dentre os compostos fenólicos, os florotaninos que formam uma classe de substâncias naturais com potencial farmacológico estão entre os compostos que apresentam atividade antioxidante. Yan e colaboradores (1996) avaliou a atividade antioxidante contra a rancificação do óleo de peixe dos florotaninos da alga *Sargassum kjellmanianum*, onde constataram que o mesmo foi 2,6 vezes maior que o BHT. Trabalho realizado por Xue e colaboradores (1998) testaram polissacarídeos hidrossolúveis e lipossolúveis de macroalgas marinhas, como resultado, todos os polissacarídeos testados apresentaram atividade antioxidante. Em outro trabalho realizado por Xue et al. (2001), com polissacarídeos de baixo peso molecular da alga parda *Laminaria japonica*, mostrou que os mesmos foram ativos na proteção da oxidação de LDL induzida por AAPH (dicloro de 2,2-azobis -2-amidinopropano).

Duan e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antioxidante da alga vermelha, *Polysiphonia urceolata*, coletada na ilha costeira do Qingdao da província de Shandong, República Popular da China. O resultado obtido demonstrou que os extratos dessa alga apresentaram elevada atividade antioxidante no ensaio de DPPH, em relação ao antioxidantes comerciais como o ácido ascórbico, ácido gálico e BHT. Zubia, Robledo & Freile-Pelegrin (2007) avaliaram a atividade antioxidante da alga parda, *Lobophora variegata* e da alga vermelha, *Chondria baileyana*, (ambas coletada no México), e as mesmas foram equivalentes à atividade antioxidante comerciais como o BHT, BHA e ácido ascórbico. Outro estudo testou treze espécies de algas, essas coletadas na costa de Kolimbari e Marathi, na Grécia. Os autores concluíram que os compostos epitanodiol e taondiol encontrada na *Taonia atomaria* (alga verde), representou uma atividade antioxidante superior ao ácido ascórbico e ao trolox (NAHAS et al,

2007). Assim podemos determinar que as algas são uma rica fonte de compostos antioxidantes naturais e as mesmas podem ser aplicadas no ponto de vista nutracêutico.

Apesar dos vários estudos encontrados na literatura com relação a atividade antioxidantes das algas, ainda temos muitos a pesquisar. Pois estudos relacionados com as macroalgas da antártica é relativamente baixos (MEDEIROS, 2013).

3.8 Cromatografia

A cromatografia foi relatada pela primeira vez em meados de 1872 – 1919, por Mikhail Semenovich Tswett. Cromatografia, que designava o processo de separação, teve sua origem do grego *chroma*, que significa “cor”. A palavra cromatografia caracterizava o processo de separação, baseia-se em duas fases (móvel e estacionária), possibilitando a utilização de diferentes compostos nessas fases, demonstrando a flexibilidade que o método ocasionava (COLLINS, 2006).

A partir da descoberta, a evolução da técnica iniciou-se na cromatografia líquida de adsorção seguida pela cromatografia de partição. E a partir dessas, outras técnicas foram descobertas, dentre elas as técnicas de cromatografia gasosa (CG) cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a mais recente a cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) (MALDANER & JARDIM, 2009).

Os principais tipos de cromatografia utilizados são a cromatografia de papel (CP), cromatografia em camada delgada (CCD), CG e a CLAE. A CP (Figura 11) é uma técnica de partição líquido-líquido, e se baseia na diferença de solubilidade das substâncias químicas entre duas fases miscíveis. É uma técnica simples, poucos instrumentos e é útil na separação de compostos polares. Já a CCD (Figura 12) é uma técnica de adsorção líquido-sólido, e a separação se dá pela diferença de afinidade entre os componentes de uma mistura pela fase estacionária. É um método simples, rápido, econômico e é utilizada no acompanhamento de reações orgânicas (PERES, 2002).

Cromatografia de Papel

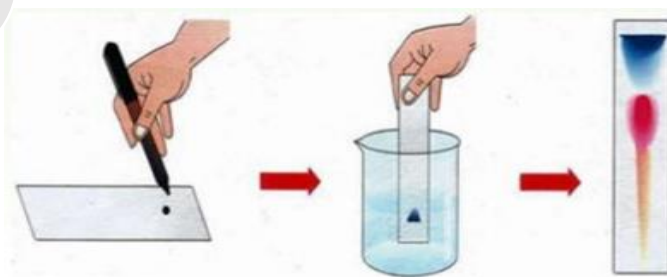


Figura 11: Exemplo de Cromatografia de papel.

<https://www.google.com/url?sa=i&url=http%3A%2F%2Ffarmacognosiaws.no.comunidades.net%2F%2Fcromatografiaplanar&psig=AOvVaw0NGNGtDAIqshWOJ1F6Y6uf&ust=1605005844516000&source=images&cd=vfe&ved=2ahUKEwiX54jrpvXsAhWkBLkGHZk8DmoQr4kDegUIARCTAQ> acessado em 09/11/2020.

Cromatografia de Camada Delgada

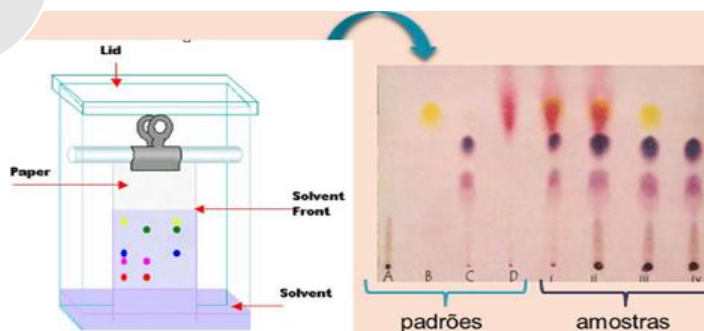


Figura 12: Exemplo de Cromatografia de Camada Delgada

<https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fslideplayer.com.br%2Fslide%2F342056%2F&psig=AOvVaw36Ys42Ns42sSPo9OwVGjzC&ust=1605006043971000&source=images&cd=vfe&ved=0CAIQjRxqFwoTCKDmpc-n9ewCFQAAAAAdAAAAABAQ> acessado em 09/11/20.

Outra técnica muito utilizada é a CG, o seu uso abrange diversas áreas, e sua funcionalidade são inúmeras. A CG é uma técnica com poder de resolução excelente, tendo possibilidade de análise em volume pequeno de amostra em uma vasta gama de substâncias. (PINHO et al, 2009; COLLINS, 2006). O método de CG proporciona muitas vantagens, mas a grande limitação que este método apresenta é que a mostra tenha que ser volátil e termicamente estável (PERES, 2002).

Outro método utilizados para análises de compostos é a CLAE, técnica responsável pelos avanços na área da cromatografia. Método adequado para separação de espécies iônicas e macromoléculas. A mais atual a cromatografia

liquida de ultra eficiência (CLUE), é um método de análises rápidas, menos consumo de solventes, e eficiência maior que a CLAE. Essas técnicas responsável pela alta eficiência requer a utilização de equipamentos específicos, alto custo de manutenção e do equipamento (PERES, 2002; DEGANI et al., 1998; MALDANER & JARDIM, 2009).

A cromatografia multidimensional (CM), utiliza a técnica de separação associada a técnicas de detecção. Além disso, utiliza o hífen para associar a técnicas utilizadas, surgindo assim, diferentes siglas denominado essas técnicas. A CM combina técnicas cromatográficas e métodos espectrais. Essa cromatografia produz frações puras ou próximas da pureza das substancias e a espectrometria reflete as informações seletivas para a identificação das substancias químicas por meio de bibliotecas ou padrões (CHINCHOLE et al., 2012). A partir disso, o acoplamento da cromatografia a técnicas espectrais, surgem siglas, dentre elas a cromatografia gasosa acoplada a espectrofotometria de massas (CG -EM), cromatografia liquida de alta eficiência acoplada a espectroscopia de infravermelho (CLAE - IR), cromatografia liquida de alta eficiência acoplada a espectrofotômetro de massa (CLAE – EM), dentre outros (PATEL et al., 2010).

A CG é um dos métodos cromatográficos muito utilizados atualmente e se destaca pela disponibilidade de uma amplo número de detectores, como a espectrometria de massas, captura de elétrons, fotométrico de chama, entre outros. Consiste em separar componentes a partir de misturas voláteis e por meio de reações químicas. Substancias não voláteis podem ser transformadas em produtos de baixo ponto de ebulição. Além disso, essas análises geralmente são rápidas e possibilitam identificar e quantificar um grande número de compostos químicos simultaneamente (PINHO et al, 2009; COLLINS, 2006). A cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização de chama (CG-FID) ou cromatografia em fase gasosa com detecção por espectrometria de massa (CG-MS) são os equipamentos utilizados atualmente para a análise de esteroides e AGs. (LOPES et al., 2013; PEREIRA et al., 2016).

Polar Biology

Sterols in Red Macroalgae from Antarctica: Extraction and Quantification by GC-MS --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	POBI-D-20-00081R1	
Full Title:	Sterols in Red Macroalgae from Antarctica: Extraction and Quantification by GC-MS	
Article Type:	Original Paper	
Corresponding Author:	Dalila Venzke, Ph.D. Universidade Federal de Pelotas BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Universidade Federal de Pelotas	
First Author:	Ivandra Ignês de Santi	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Ivandra Ignês de Santi Bruna Silveira Pacheco Dalila Venzke, Ph.D. Rogério Antonio Freitag Leandro Silva de Almeida Pio Colepicolo Mutue Toyota Fujii Daiane Dias Claudio M. P. Pereira	
Funding Information:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((PROANTAR/MCT/CNPq-No.23/ 2009; 64/2013))	Not applicable
Abstract:	Antarctica is considered a major reservoir of microorganisms and macroorganisms, including seaweed, which can biosynthesize secondary metabolites with unique structures and specific biological activities. Macroalgae are considered an interesting source of steroids, a class of metabolites involved in the control of membrane fluidity and permeability. This study reports the extraction and quantification of sterols in four red macroalgal species from Antarctica: <i>Palmaria decipiens</i>, <i>Plocamium cartilagineum</i>, <i>Iridaea cordata</i> and <i>Pyropia endiviifolia</i>. The extraction of sterols involved alkaline hydrolysis from algal biomass. The quantification of cholesterol, brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β-sitosterol and fucosterol were performed by gas chromatography together with mass spectrometry (GC-MS). In general, cholesterol was the most abundant compound (216.32 to 3195.69 mg kg⁻¹), followed by β-sitosterol (131.42 to 654.18 mg kg⁻¹), stigmasterol (68.35 to 393.20 mg kg⁻¹), brassicasterol (68.56 to 337.43 mg kg⁻¹), campesterol (64.95 to 277.78 mg kg⁻¹) and fucosterol (57.67 to 286.18 mg kg⁻¹). Brassicasterol was not found in <i>I. cordata</i>, but it was identified in the other three samples. This work enriches the knowledge about the profile of steroids biosynthesized by Antarctic macroalgae and supports research to discover bioactive compounds with nutraceutical and pharmaceutical applications.	
Response to Reviewers:		
Order of Authors Secondary Information:		

Sterols in Red Macroalgae from Antarctica: Extraction and Quantification by GC-MS

Ivandra Ignês de Santi¹, Bruna Silveira Pacheco², Dalila Venzke¹, Rogério Antonio Freitag¹, Leandro Silva de Almeida³, Pio Colepicolo⁴, Mutue Toyota Fujii⁵, Daiane Dias³ and Claudio M. P. Pereira¹

¹ Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Science, Federal University of Pelotas, Laboratory of Lipidomics and Bioorganics (LLipBio) 96010-900, Capão do Leão Campus, RS, Brazil.

² Posgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Pelotas 96010-900, Capão do Leão Campus, RS, Brazil.

³ School of Chemistry and Food, Federal University of Rio Grande, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil.

⁴ Biochemistry Department, Chemistry Institute, University of São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 748, São Paulo, SP, Brazil.

⁵ Institute of Botany, Center for Research in Avascular Plants and Fungi, Nucleus for Phycology Research. Avenida Miguel Estefano, 3687 Agua Funda, São Paulo, SP, Brazil.

* Corresponding author. Claudio M. P. Pereira

* E-mail address: lahbbioufpel@gmail.com

Abstract

Antarctica is considered a major reservoir of microorganisms and macroorganisms, including seaweed, which can biosynthesize secondary metabolites with unique structures and specific biological activities. Macroalgae are considered an interesting source of steroids, a class of metabolites involved in the control of membrane fluidity and permeability. This study reports the extraction and quantification of sterols in four red macroalgal species from Antarctica: *Palmaria decipiens*, *Plocamium cartilagineum*, *Iridaea cordata* and *Pyropia endiviifolia*. The extraction of sterols involved alkaline hydrolysis from algal biomass. The quantification of cholesterol, brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and fucosterol were performed by gas chromatography hyphenated with mass spectrometry (GC-MS). In general, cholesterol was the most abundant compound (216.32 to 3195.69 mg kg⁻¹), followed by β -sitosterol (131.42 to 654.18 mg kg⁻¹), stigmasterol (68.35 to 393.20 mg kg⁻¹), brassicasterol

(68.56 to 337.43 mg kg⁻¹), campesterol (64.95 to 277.78 mg kg⁻¹) and fucosterol (57.67 to 286.18 mg kg⁻¹). Brassicasterol was not found in *I. cordata*, but it was identified in the other three samples. This work enriches the knowledge about the profile of steroids biosynthesized by Antarctic macroalgae and supports research to discover bioactive compounds with nutraceutical and pharmaceutical applications.

Keywords: Polar biota; King George Island; Marine algae; Rhodophyceae; Phytosterols analysis.

Introduction

Polar regions like Antarctica are special ecosystems characterized by biota that differ from elsewhere in the world (Rogers 2007; Lyon et al. 2014). The literature estimates the existence of 124 species (Wiencke and Clayton 2002; Hommersand et al. 2011) of seaweed present in the Antarctic regions, represented by Rhodophyta, Heterokontophyta and Chlorophyta. The Antarctic marine flora is well adapted to extreme climatic conditions (Bischoff-Bäsmann and Wiencle 1996), and it is characterized by a high degree of endemism (Clayton 1994), with highest abundance among the Heterokontophyta (44%) and Rhodophyta (36%) (Wiencle et al. 2014).

To survive in the Antarctic environment, seaweed and other polar organisms require biochemical and physiological adaptations to low temperatures, strong winds, low nutrient availability and high UV radiation (Santiago et al. 2015). As a result of these adaptations, the organisms produce a significant diversity of secondary metabolites with unique chemical structures (Lopes et al. 2011). Marine macroalgae are an important source of bioactive compounds that are used in foods, textiles and pharmaceuticals (Rocha et al. 2007; Villarreal-Gómez et al. 2007; Rautenberger et al. 2015; Lopes et al. 2011; Do Amaral et al. 2020).

The metabolites present in seaweed can be found in the form of heterocyclic compounds, fatty acids, terpenes, polysaccharides, peptides, proteins, alkaloids and phenolic compounds (Bhakuni and Rawat 2005; Leal et al. 2013; Percot et al. 2009; De Freitas et al. 2020). They are also a rich source of sterols, which can be found in their free form, as esterified fatty acids, or at low concentrations involved in glycosylated conjugates (Lopes et al. 2011). The presence and kind of sterols in macroalgae are diversified (Giner et al. 2008) since these organisms have different origins, evolutionary and biochemical lines (Lee 2008). Sterols are essential components of membranes and have the function of controlling membrane fluidity and permeability. Sterols from plants, fungi and animals show marked

differences due to their different biosynthesis pathways (Kim et al. 2011). The variations in steroid structures in algae have implications for cellular plasticity and membrane permeability (Gouveia et al. 2010).

Steroids are synthesized from mevalonate (MVA), which is contained in the cytosol (Moreau et al. 2002). In algae, sterols can also be biosynthesized via 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate/1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate (MEP/DOXP), which is contained in plastids (Hernandes-Ledesma and Herrero 2014). However, the biosynthesis of these compounds shares compounds of the isoprenoid metabolic pathway, since the triterpenoid squalene is a common intermediate in the two pathways (Lopes et al. 2011). The metabolic biosynthesis route depends on the evolutionary background of each alga (Kumari et al. 2013). Although there is a wide variety of sterols in algae, the most abundant in nature and available for human consumption are β -sitosterol, campesterol and stigmasterol (Moreau et al. 2000; Kumari et al. 2013). On the other hand, in red algae cholesterol is generally the major compound (Al Easa et al. 1995; Kendel et al. 2013; Kendel et al. 2015), followed by β -sitosterol, campesterol and stigmasterol (Al Easa et al. 1995; Lopes et al. 2011; Kazłowska et al. 2013).

Phytosterols are recognized for their valuable health-promoting effects, such as anticancer, anti-inflammatory, antibacterial and antifungal activities (Kim et al. 2011; Menéndes-Carreño et al. 2012). They have also shown ability to lower “bad” low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels, being used in their free form or esterified in functional food formulations (Kim et al. 2011; Menéndes-Carreño et al. 2012). Demand for food and derivatives rich in bioactive compounds is growing, and algae an excellent source of these compounds. Their consumption is an interesting alternative from a nutraceutical point of view (Menéndes-Carreño et al. 2012).

In this context, the aim of this study was to identify and quantify six sterols (cholesterol, brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and fucosterol) by a GC-MS procedure in four Antarctic red macroalgae: *Palmaria decipiens* (Reinsch) R. W. Ricker, *Plocamium cartilagineum* (Linnaeus) P. S. Dixon, *Iridaea cordata* (Turner) Bory de Saint-Vincent and *Pyropia endiviifolia* (A.Gepp & E.Gepp) H. G. Choi & M. S. Hwang. In addition, this work provides chemical information to support research into bioactive compounds from Antarctic macroalgae.

Material and Methods

Reagents and chemicals

Standards (minimal purity level in parentheses) of cholesterol (99%) (CAS number: 57-88-5), brassicasterol (87%) (CAS number: 474-67-9), ergosterol (95%) (CAS number: 57-87-4), campesterol (65%) (CAS number: 474-62-4), stigmasterol (95%) (CAS number: 83-48-7), and β -sitosterol (95%) (CAS number: 83-46-5) and fucosterol (93%) (CAS number: 17605-67-3) were obtained from Sigma (USA). All standards were prepared in HPLC-grade n-hexane (Merck, Germany). Ethanol was purchased from Merck (Germany). Sodium chloride, potassium hydroxide and anhydrous sodium sulfate were obtained from Sigma-Aldrich (Germany).

Samples

Samples of red macroalgae *P. decipiens*, *P. cartilagineum*, *I. cordata* and *P. endiviifolia* were collected in different sites of King George Island (Antarctica), during the low tide period, as described in Table 1. Each sample corresponds to a mixture of five individuals of each species and all parts of the macroalgae were used. The authenticity of collected algae biomass was identify by an expert in the area of phycology, Dr Mutue Toyota Fujii. The material was compared to a database of Botanic Institute of São Paulo. Part of this collection was reported previously in the literature by Fujii et al. (2014). The samples were frozen at -80 °C, lyophilized and stored in plastic bags protected from light until extraction of the compounds.

Table 1. Macroalgae collected at different sites of King George Island (Antarctica)

Extraction of sterols

Extraction of sterols from the samples was carried out in triplicate (n = 3) and was performed as described by Lopes and co-workers (Lopes et al. 2011). In a 100 mL volumetric flask, 0.5 g of freeze-dried algal biomass was saponified with 40 mL of ethanolic 10% KOH solution (for 1 h) with constant stirring (1000 rpm) and temperature of 70 °C. The mixture was kept at room temperature (25 °C), centrifuged (3 min at 5000 rpm) and decanted. The sample was then transferred to a separation funnel with 20 mL of saturated NaCl solution and 10 mL of hexane (this process was repeated twice). The hexane extracts were combined and dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and the solvent was evaporated to dryness. The sample was suspended in 200 μ L of n-hexane for GC-MS analyses.

Analyses of sterols by GC-MS

Sterols were quantified with a gas chromatograph (GC-17A - Shimadzu / Class GC 2010) equipped with split/splitless injector and mass detector (MS), and an Elite 5 MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m) capillary column. The following conditions were used: helium carrier gas at flow rate of 1 mL min⁻¹ in mode splitless; 1 μ L sample volume; and programmed oven temperature starting at 150 °C, kept at this temperature for 1 min with a heating ramp at 10 °C min⁻¹ until 320 °C, maintained for 4 min. The injector was maintained at 250 °C. The ion source of the mass spectrometer was set at 250 °C and the ionisation voltage was 70 eV. Fragments were analyzed from m/z 40–700. The analyses were performed for 22 minutes. The sterols were identified by comparison of the retention times and MS fragments found in the extracts with those obtained from available steroid standards. The sterols concentrations were estimated from calibration curves generated by plotting of the peaks area of standards against their solutions at six different concentrations (1-100 μ g mL⁻¹).

Statistical analysis

Data on total concentration of sterol in different algal species are presented as mean $\pm$ SD. Evaluation of these results was performed applying one-way analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's *post hoc* test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (Version 7.0, 2016) and the limit of statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

The steroids were extracted in triplicate from the algal biomass and were analyzed by GC-MS. The ions were monitored at *m/z* 386 for cholesterol, 398 for brassicasterol, 400 for campesterol, 412 for stigmasterol and fucosterol, and 414 for β -sitosterol, respectively. The chromatogram of the sterol standards, their retention times and MS data are provided as Online Resource 1 and 2.

The sterol concentrations quantified in the samples are presented in Table 2. The sample that showed the highest total sterol concentration levels was *I. cordata* (3.98 g kg⁻¹). *P. decipiens* and *P. cartilagineum* showed intermediate values (2.47 and 1.42 g kg⁻¹, respectively) and *P. endiviifolia* showed the lowest level of sterol concentration (0.64 g kg⁻¹) among the samples evaluated. The results for sterol concentrations were significantly different in most red macroalgae analyzed. In general, the relative standard deviation was smaller than 12%.

Table 2. Total sterol concentrations quantified in *Palmaria decipiens*, *Plocamium cartilagineum*, *Iridaea cordata* and *Pyropia endiviifolia*.

In general, the relative percentages of cholesterol quantified in these samples were between 21.0 and 80.2% (216.32 and 3195.69 mg kg⁻¹), brassicasterol (if present) 4.6 and 13.7% (68.56 and 337.43 mg kg⁻¹), campesterol 3.3 and 11.3% (64.95 to 277.78 mg kg⁻¹), stigmasterol 4.8 and 15.9% (68.35 and 393.20 mg kg⁻¹), β -sitosterol 7.6 and 26.5% (131.42 and 654.18 mg kg⁻¹), and fucosterol 3.9 and 11.6% (57.67 to 286.18 mg kg⁻¹) (Table 2 and 3). Additionally, brassicasterol was not quantified in *I. cordata*, but it was quantified in the other three samples. Cholesterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and fucosterol were present in all samples, with different concentrations. Cholesterol was the major compound in three samples. In *P. endiviifolia*, cholesterol presented 33.6% concentration followed by β -sitosterol (24.0%). In *I. cordata* and *P. cartilagineum*, cholesterol was also the major compound (80.2 and 68.6%, respectively) followed by β -sitosterol (7.6 and 9.3%, respectively). However, in *P. decipiens* the major compound was β -sitosterol (26.5%) followed by cholesterol (21%) (Figure 1).

Figure 1. Percentages of fucosterol, β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, brassicasterol and cholesterol in relation to the total content of sterols.

Discussion

The species *P. decipiens*, *I. cordata* and *P. endiviifolia* included in this study have relatively restricted geographic distribution, being endemic to Antarctica and sub-Antarctic regions (Ricker 1987; Wiencke and Clayton 2002). On the other hand, *P. cartilagineum* is widely distributed throughout the world's oceans, including the cold waters of the Arctic and Antarctic, temperate waters of Europe, Asia, Africa and the Americas, and tropical waters of the Pacific, Atlantic and Indian Oceans (Young et al. 2013; Laturus et al. 1997).

Seaweeds are a promising source of phytosterols and have attracted the attention of researchers due of their health effects in human diets (Hernandes-Ledesma and Herrero 2014). They are structural components of membranes, playing an important role in the control of membrane fluidity and permeability, signal transduction and as hormones (Hernandes-Ledesma and Herrero 2014).

In this study, the four species of red macroalgae evaluated (*P. decipiens*, *P.*

cartilagineum, *I. cordata* and *P. endiviifolia*) showed a great diversity in their steroid profile (Table 2). Although all species were collected in Antarctic significant differences in their sterols composition and concentrations among the species were observed. Of the six steroids identified in this study, cholesterol was the most abundant in three species (*I. cordata*, *P. endiviifolia* and *P. cartilagineum*) and β -sitosterol was the major sterol in *P. decipiens* (Table 2). In a previous work, we also found a significant variation in the sterol profile of six species of brown macroalgae (*Adenocystis utricularis*, *Ascoseira mirabilis*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia antarctica*, and *Himantothallus grandifolius*) from Antarctic determined by LC-MS/MS (Pereira et al. 2017). This variation occurs because each species produces a unique steroid profile as a result of biochemical and physiological adaptations (Santiago et al. 2015). The sterols contents may be varying in concentrations due to ecological conditions, the macroalgae life cycle and their development stage at the time they are collected (Piironen et al. 2000; Lopes et al. 2011; Teixeira et al. 2019).

Literature data also suggest that sterol composition in algae can change due different environmental conditions so as to fulfill their functions in cell membranes (Teixeira et al. 2019). It is known that changes in the membrane sterol composition affect the membrane permeability and function (Valitova et al. 2010). In low temperatures as found in Antarctic, one of the protective mechanisms of algae to survive is increasing their membrane fluidity (Lyon et al. 2014). However, the efficiency in membrane fluidity and permeability regulation varies among the phytosterols. Cholesterol has shown the largest stabilizing effect on membranes, followed by campesterol, β -sitosterol, and stigmasterol (Grunwald, 1971; Hodzic et al. 2008).

Table 3 shows comparison between the relative concentrations determined by us and the results reported previously for the same types of red macroalgae. Lopes et al. (2011) reported that the major relative sterol quantified by HPLC-DAD in *P. cartilagineum* from Portuguese coastal waters was also cholesterol (53.5%) followed by fucosterol (31%). However, they did not identify β -sitosterol. Sánchez-Machado et al. (2014) also analyzed *P. decipiens* (by LC-MS), but the proportion of cholesterol was 1.3% and β -sitosterol was not analyzed. In addition, the authors showed that both methodologies using liquid chromatography were not efficient to separate campesterol and stigmasterol (Lopes et al. 2011; Sánchez-Machado et al. 2014). However in this work, it was possible to separate and quantify these two steroids by GC-MS.

Our findings showed that the steroid profile and concentration of macroalgae varied significantly in relation to the species *P. decipiens* from Spain and *P. cartilagenium* from western Portuguese coast previously reported in the literature. Table 3 shows that the species

under study contain higher concentrations of the investigated sterols, with the exception of campesterol, stigmasterol and fucosterol, which were higher in the *P. cartilagenium* species described in the literature. β -sitosterol was found in a significant concentration in our samples, however there are no reports in the literature of the presence of this sterol in *P. decipiens* and *P. cartilagineum* species (Lopes et al. 2011; Sánchez-Machado et al. 2014). The unusual sterol profile found in the species investigated in this study might be the result of biochemical and physiological adaptations of macroalgae to survive in the Antarctic environment, such as water low temperatures (below 0 °C most of the time), high UV radiation and salinity variation (Santiago et al. 2015; Siddall et al. 2010; Kumari et al. 2013).

Table 3. Relative sterol contents from the literature and the present work found in red macroalgae

In addition, sterols can be used as chemotaxonomic markers in macroalgae to distinguish members of Rhodophyceae (red algae), Chlorophyceae (green algae) and Phaeophyceae (brown algae) (Hernandes-Ledesma and Herrero 2014). Cholesterol is the predominant sterol in red Rodophyta (Al Easa et al. 1995; Kendel et al. 2013; Kendel et al. 2015), while fucosterol predominates in Phaeophyta and in Chlorophyta the major sterols are isofucosterol in *Uvales* and clionasterol in *Bryopsidales* and *Siphonocladales* (Hernandes-Ledesma and Herrero 2014; Kumari et al. 2013). Among microalgae, the distribution of steroids is very diverse, with detection of dihydroxysterols in haptophytes, 24-propylidenecholesterol in pelagophytic algae and 4-desmethyl-23,24-dimethyl steroids in diatoms. Also, crinosterols, stigmasterols have been isolated from chlororachinophytes and dinosterols and dinostanols from dinophytes, except for the Kareniaceae members and *Polarella glacialis* (Kumari et al. 2013). Sterols can also show distinct patterns in fungi, with ergosterol being the major sterol biosynthesized (Volkman 2003).

Tables 4 and 5 report the concentration levels of some sterols identified in other red algae by gas and liquid chromatography, respectively. In the samples analyzed by gas chromatography (Table 4), cholesterol was the major relative compound identified in *Solieria chordalis* (C.Agardh) J. Agardh (80.3%), *Chondria collinsiana* M. Howe (72.9%), *Palisada thuyoides* (Kützinger) Cassano, Senties, Gil-Rodríguez & M.T.Fujii (as *Laurencia paniculata*) (100%), *Palisada perforata* (Bory) K.W.Nam (as *Laurencia papillosa*) (68.7%), *Melanothamnus ferulaceus* (Suhr ex J.Agardh) Díaz-Tapia & Maggs (as *Polysiphonia ferulacea*) (47.5%) and *Grateloupia turuturu* Yamada (87.7%). In *Spyridia filamentosa*

(Wulfen) Harvey, the proportion of cholesterol (23.8%) (Al Easa et al. 1995) was the same as the other compounds (which were not analyzed in our samples). In *Chondria collinsiana*, β -sitosterol had the second highest concentration while in *Spyridia filamentosa* it was the major compound (Al Easa et al. 1995). In *Palisada perforata*, stigmasterol had the second highest concentration (31.3%) (Al Easa et al. 1995). *Digenea simplex* (Wulfen) C.Agardh, *Polysiphonia brodiae* (Dillwyn) Sprengel, *Spyridia filamentosa* and *Chondria armata* (Kützinger) Okamura presented smaller concentrations of cholesterol (30.2, 32.0, 23.8, 12.0%, respectively) than the other samples shown in Table 4 (Al Easa et al. 1995; Govenkar and Wahidulla 2000).

As described above, the steroid composition can be useful in the taxonomic classification of macroalgae. According literature data, cholesterol is the dominant sterol in Rodophyta (Al Easa et al. 1995; Kendel et al. 2013; Kendel et al. 2015). In this study, with the exception *P. decipiens* species (in which the major sterol was β -sitosterol), in all other species evaluated cholesterol was the major sterol which support cholesterol-based chemotaxonomy in Rodophyta macroalgae (Table 2; Figure 1).

Moreover, through the results shown in Table 4, some correlations between the collection site and algal groups can be observed. *S. chordalis* and *G. turuturu* collected in France showed similar relative cholesterol content and in both brassicasterol and fucosterol were also identified. Through the analysis of steroid content of the *Chondria* genus, *Chondria collinsiana* collected in Qatar showed higher content of steroids compared to the species collected in Anjuna (*C. armata*). Regarding algae from Qatar, the *Laurencia* genus presented substantial relative sterol contents, with cholesterol being the major compound. The *Polysiphonia* genus had lower relative cholesterol content in comparison with the *Laurencia* genus, but other sterols, such as β -sitosterol and ergosterol, were also identified. Ergosterol was also detected in *S. filamentosa*. Although ergosterol is a fungal marker, it has also been reported in green and red algae (Volkman, 2003; Al Easa et al. 1995). However, the presence of ergosterol can also indicate contamination of macroalgae by their associated endophytic fungi. It is known that macroalgae can form a secretion called mucilage which acts as an attractive factor for colonizing microorganisms, such as fungi (Teixeira et al. 2019).

Table 4. Relative sterol contents from the literature in red macroalgae determined by GC-MS

In the results shown in Table 5, it is possible to observe that cholesterol was the major relative compound in *Asparagopsis armata* Harvey, *Osmundea pinnatifida* (Hudson)

Stackhouse, *Schizymenia dubyi* (Chauvin ex Duby) J.Agardh (52.1, 70.3, 88.4%, respectively) (Lopes et al. 2011). However, it was also identified in smaller concentrations in *Pyropia dentata* (Kjellman) N.Kikuchi & M.Miyata (as *Porphyra dentata*), *Sphaerococcus coronopifolius* Stackhouse and *Porphyra* sp. (15.0, 34.1 and 8.6%, respectively) in comparison with the other compounds (Lopes et al. 2011; Kasbowska et al. 2013). Among the species of the genus *Porphyra*, the species collected in Portugal showed lower contents of sterols. Additionally, β -sitosterol was the major relative steroid found in *Pyropia dentate* (Kasbowska et al. 2013).

Table 5. Relative sterol contents from the literature in red macroalgae determined by HPLC

According to our results, the macroalgae species under study showed a very diverse composition of steroids when compared to other species of red algae reported in the literature. Although cholesterol was the major compound in most of samples analyzed in this work and in previous studies, variation in the compounds' concentration levels can be observed. It is possible to note that many of the steroids identified in this work as brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -Sitosterol and fucosterol are not present in many red algae reported in the literature. This can be explained by ecological differences, geographic origins, salinity and temperature of seawater, the diversity of samples, collection settings and life time (Kapetanovic' et al. 2005; Lopes et al. 2011; Lee 2008).

It is worth noting that the presence of sterols in macroalgae is important because they have important ecological functions and biological activities. Fucosterol, for example, has an ecological role in chemical defense against fish feeding (Majik et al. 2015). β -sitosterol, stigmasterol and campesterol identified as main sterols in *n*-hexane extract of *Prasiola crispa* from Antarctic induced insecticidal activity in *Nauphoeta cinerea* cockroache (Lorensi et al. 2019). In addition, literature data also reported the therapeutic properties of fucosterol that include inhibition of cholesterol absorption and anticancer, antidiabetic and antioxidant activities (Ikeda et al. 1988; MacKay and Jones 2012; Lagarda et al. 2006; Lee. et al. 2003). Campesterol and brassicasterol likewise are known to exhibit cholesterol-lowering effects by decreasing intestinal cholesterol absorption (Kendel, et al. 2015). β -sitosterol showed anthelmintic, antioxidant and antidiabetic effects and stigmasterol has anti-inflammatory and antihypercholesterolemic activities (Villasenor et al. 2002; Vivancos et al. 2005; Gupta et al. 2011; Gabay et al. 2010; Chandler et al. 1979).

In summary, this study describes the identification and quantification of six sterols (cholesterol, brassicasterol, campesterol, stigmasterol, β -sitosterol and fucosterol) from four species of Antarctic red macroalgae (*P. decipiens*, *P. cartilagineum*, *I. cordata* and *P. endiviifolia*) by GC-MS. Since there are few studies on steroids in macroalgae from Antarctica, this study contributes to the knowledge of the chemical composition of the species under study and their possible bioactive applications as nutraceuticals and pharmaceuticals. In addition, the results reported here can be applied in future studies to investigate steroid profiles in Antarctic macroalgae and other microorganisms found in polar regions, such as microalgae and fungi.

Author Contributions

CMP, PC and RAF conceived and designed research. BSP collected the macroalgae samples. MTF identify the authenticity of collected algae biomass. IIS promoted the steroid extractions. DD and LSA conducted the chromatographic analysis. DD, BSP and DV analyzed data and wrote the manuscript. DV formatted and revised the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Acknowledgments

This study had financial and logistic support from the Brazilian Antarctic Program (PROANTAR/MCT/CNPq-No.23/ 2009; 64/2013) and Brazilian Navy. We thank Mhali Translators for the English correction. We would like thank Chief Editor Dieter Piepenburg and the four reviewers; Antje Labes and three anonymous referees for their important comments which helped to improve the manuscript.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict interest.

References

Al Easa HS, Kornprobst JM, Rizk AM (1995) Major sterol composition of some algae

from Qatar. *Phytochemistry* 39:373-374. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(94\)00968-Y](https://doi.org/10.1016/0031-9422(94)00968-Y)

Bhakuni DS, Rawat DS (2005) *Bioactive marine natural products*. Springer, New York, pp.1-9.

Bischoff-Bäsmann B, Wiencke C (1996) Temperature requirements for growth and survival of Antarctic Rhodophyta. *J Phycol* 32:525–535. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00525.x>

Chandler RF, Hooper SN, Ismail HA (1979) Antihypercholesterolemic studies with sterols: β -sitosterol and stigmasterol. *J Pharm Sci* 68:245-247. <https://doi.org/10.1002/jps.2600680235>

Clayton MN (1994) Evolution of the Antarctic marine benthic algal flora. *J Phycol* 30:897–904. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1994.00897.x>

De Freitas SC, Berneira LM, Dos Santos MAZ, Poletti T, Mansilla A, Astorga-España MS, Garcia MO, Hartwig DD, Hubner SO, Pereira CMP (2020) Bioactivity evaluation and composition of extracts from sub-Antarctic macroalgae *Mazzaella laminarioides* at distinct development phases. *Braz J Bot* 43:689–696. <https://doi.org/10.1007/s40415-020-00661-0>

Do Amaral CCF, Pacheco BS, Seixas FK, Pereira CMP, Collares T (2020) Antitumoral effects of fucoidan on bladder cancer. *Algal Res* 47:101884. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101884>

Fujii MT, Yoneshigue-Valentin Y, Yokoya NS, Pupo D, Guimaraes SMPB, Silva IB, Dalto AG, Martins AP, Pereira DC, Souza JMC, Pereira CMP, Mansilla A, Pellizzari FM, Colepicolo P (2014) *Macroalgas Marinhas da Antártica*. 1st edn. Cubo, São Carlos, pp. 1-93.

Gabay O, Sanchez C, Salvat C, Chevy F, Breton M, Nourissat G, Wolf C, Jacques C, Ferenbaum F (2010) Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthr Cartil* 18:106-116. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2009.08.019>

- Giner JL, Zhao H, Tomas C (2008) Sterols and fatty acids of three harmful algae previously assigned as *Chattonella*. *Phytochemistry* 69:2167-2171.
<https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2008.05.013>
- Gouveia L, Marques AE, Sousa JM, Mora P, Bandarra, NM (2010) Microalgae – source of natural bioactive molecules as functional ingredients. *Food Sci Tech Bull Funct Foods* 7:21–37. <https://doi.org/10.1616/1476-2137.15884>
- Govenkar MB, Wahidulla S (2000) Free Sterols of the Red Alga *Chondria armata* (Kütz.) Okamura. *Bot Mar* 43:201-204. <https://doi.org/10.1515/BOT.2000.021>
- Grunwald C (1971) Effects of free sterols, steryl ester, and steryl glycoside on membrane permeability. *Plant Physiol* 48:653-655. <https://doi.org/10.1104/pp.48.5.65>
- Gupta A, Sharma AK, Dobhal MP, Sharma MC, Gupta RS (2011) Antidiabetic and antioxidant potential of β -sitosterol in treptozotocin-induced experimental hyperglycemia. *J Diabetes* 3:29-37. <https://doi.org/10.1111/j.1753-0407.2010.00107.x>
- Hernandez-Ledesma B, Herrero M (2014) Sterols in Algae and Health. In: Lopes G, Sousa C, Valentão P, Andrade, P (eds) *Bioactive Compounds from Marine Foods*, 1 st edn. Wiley Blackwell, Chinchester, pp.173-187.
- Hodzic A, Rappolt M, Amenitsch H, Laggner P, Pabst G (2008) Differential modulation of membrane structure and fluctuations by plant sterols and cholesterol. *Biophys J* 94:3935-3944. <https://doi.org/10.1529/biophysj.107.123224>
- Hommersand MH, Moe RL, Amsler CD, Fredericq S (2009) Notes on the systematics and biogeographical relationships of Antarctic and sub-Antarctic Rhodophyta with descriptions of four new genera and five new species. *Bot Mar* 52:509-534.
<https://doi.org/10.1515/BOT.2009.081>
- Ikeda I, Tanaka K, Sugano M, Vahouny GV, Gallo LL (1988) Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *J Lipid Res* 29:1573-1582. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)38403-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)38403-0)

- Kapetanovic' R., Sladic D, Popo S, Zlatovic M., Kljajic Z, Gasic MJ (2005) Sterol composition of the Adriatic Sea algae *Ulva lactuca*, *Codium dichotomum*, *Cystoseira adriatica* and *Fucus virsoides*. J Serbian Chem Soc 70:1395–400. <https://doi.org/10.2298/JSC0512395K>
- Kazlowska K, Lin HV, Chang S, Tsai1 G (2013) In vitro and in vivo anticancer effects of sterol fraction from red algae *Porphyra dentate*. J Evidence-Based Complementary Altern Med 2013:1-10. <https://doi.org/10.1155/2013/493869>
- Kendel M, Couzinet-Mossion A, Viau M, Fleurence J, Barnathan G, Wielgosz-Collin G (2013) Seasonal composition of lipids, fatty acids, and sterols in the edible red alga *Grateloupia turuturu*. J Appl Phycol 25:425-432. <https://doi.org/10.1007/s10811-012-9876-3>
- Kendel M, Wielgosz-Collin G, Bertrand S, Roussakis C, Bourgougnon N, Bedoux G (2015) Lipid composition, fatty Acids and sterols in the seaweeds *Ulva armoricana*, and *Solieria chordalis* from Brittany (France): An analysis from nutritional, chemotaxonomic, and antiproliferative activity perspectives. Mar Drugs 13:5606-5628. <https://doi.org/10.3390/md13095606>
- Kim SK, Van TQ (2011) Potential Beneficial Effects of Marine Algal Sterols on Human Health. Adv Food Nutr Res 64:191–198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387669-0.00014-4>
- Kumari P, Reddy CRK, Kumar M, Jha B (2013) Algal lipids, fatty acids and sterols. In: Domínguez H (ed) Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals, 1st edn, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, pp. 87-134.
- Lagarda MJ, Garcia-Llatas G, Farré R (2006) Analysis of phytosterols in foods. J Pharmaceut Biomed 41:1486–1496. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.02.052>
- Laternus F, Adams FC, Gómez I, Mehrtens G (1997) Halogenating activities detected in Antarctic macroalgae. Polar Biol 17:281-284. <https://doi.org/10.1007/s0030000050133>

- Leal MC, Munro MHG, Blunt JW, Puga J, Jesus B, Calado R, Rosa R, Madeira C (2013) Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. Nat Prod Rep 30:1380-1390. <https://doi.org/10.1039/c3np70057g>
- Lee RE (2008) Phycology. Cambridge University Press, Colorado, pp 1-27.
- Lee S, Lee Y, Jung S, Sam K, Kuk S (2003) Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*. Arch Pharm Res 26:719–722. <https://doi.org/10.1007/BF02976680>
- Lopes G, Sousa C, Bernardo J, Andrade PB, Valentão P, Ferreres F, Mouga T (2011) Sterol profiles in 18 macroalgae of the portuguese coast. J Phycol 47:1210-1218. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2011.01028.x>
- Lorensi GH, Oliveira RS, Leal AP, Zanatta AP, De Almeida CGM, Barreto YC, Rosa ME, Vieira PB, Ramos CJB, Victoria FC, Pereira AB, Teixeira VL, Dal Belo CA (2019) Entomotoxic Activity of *Prasiola crista* (Antarctic Algae) in *Nauphoeta cinerea* Cockroaches: Identification of Main Steroidal Compounds. Mar Drugs 17:573. <https://doi.org/10.3390/md17100573>
- Lyon BR, Mock T (2014) Polar Microalgae: New Approaches towards Understanding Adaptations to an Extreme and Changing Environment. Biology 3:56-80. <https://doi.org/10.3390/biology3010056>
- Mackay DS, Jones PJ (2012) Plasma noncholesterol sterols: current uses, potential and need for standardization. Curr Opin Lipidol 23:241–247. <https://doi.org/10.1097/MOL.0b013e328353292e>
- Majik MS, Adel H, Shirodkar D, Tilvi S, Furtado J (2015) Isolation of stigmast-5,24-dien-3-ol from marine brown algae *Sargassum tenerrimum* and its antipredatory activity. RSC Adv 5:51008–51011. <https://doi.org/10.1039/C5RA07489D>
- Menéndez-Carreño M, Steenbergen H, Janssen HG (2012) Development and validation of a comprehensive two-dimensional Gas Chromatography–Mass Spectrometry method for the

analysis of phytosterol oxidation products in human plasma. Anal Bioanal Chem 402:2023-2032. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5432-2>

Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB (2002) Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. Prog Lipid Res 41:457-500. [https://doi.org/10.1016/S0163-7827\(02\)00006-1](https://doi.org/10.1016/S0163-7827(02)00006-1)

Percot A, Guven KC, Aysel V, Erdugan H, Gezgin T (2009) N-acetyltyramine from *Phyllophora crispa* (Hudson) P.S. Dixon and N-acetylphenylethylamine from *Gelidium crinale* (Hare ex Turner) Graillon. Acta Pharm Sci 51:9–14.

Pereira CMP, Nunes CFP, Zambotti-Villela L, Streit NM, Dias D, Pinto E, Gomes CB, Colepicolo P (2017) Extraction of sterols in brown macroalgae from Antarctica and their identification by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. J Appl Phycol 29:751-757. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-0905-5>

Piironen V, Lindsay DG, Miettinen TA, Toivo J, Lampi AM (2000) Plant sterols: biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. J Sci Food Agric 80:939–966. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(20000515\)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(20000515)80:7<939::AID-JSFA644>3.0.CO;2-C)

Rautenberger R, Huovinen P, Gómez I (2015) Effects of increased seawater temperature on UV tolerance of Antarctic marine macroalgae. Mar Biol 162:1087-1097. <https://doi.org/10.1007/s00227-015-2651-7>

Ricker RW (1987) Taxonomy and Biogeography of Macquarie Island Seaweeds. British Museum (Natural History), London, pp. 344.

Rocha FD, Pereira RC, Kaplan MAC, Teixeira VL (2007) Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. Rev Bras Farmacogn 17:631-639. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2007000400024>

Rogers AD (2007) Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. Phil Trans R Soc B 362: 2191–2214. <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1948>

536

537 Sánchez-Machado DI, López-Hernández J, Paseiro-Losada P, López-Cervantes J (2004) An
538 HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds. *Biomed Chromatogr* 18:
539 183-190. <https://doi.org/10.1002/bmc.316>

540

541 Santiago IF, Soares MA, Rosa CA, Rosa LH (2015) Lichensphere: A protected natural
542 microhabitat of the non-lichenised fungal communities living in extreme environments of
543 Antarctica. *Extremophiles* 19:1087–1097. <https://doi.org/10.1007/s00792-015-0781-y>

544

545 Siddall M, Kaplan MR, Schaefer JM, Putnam A, Kelly MA, Goehring B (2010) Changing
546 influence of Antarctic and Greenlandic temperature records on sea-level over the last glacial
547 cycle. *Quaternary Sci Rev* 29:410–423. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2009.11.007>

548

549 Teixeira TR, Santos GS, Turatti ICC, Paziani MH, Von Zeska Kress MR, Colepicolo P,
550 Deboni HM (2019) Characterization of the lipid profile of Antarctic brown seaweeds and
551 their endophytic fungi by Gas Chromatography–Mass spectrometry (GC–MS). *Polar Biol*
552 42:1431–1444. <https://doi.org/10.1007/s00300-019-02529-w>

553

554 Valitova YN, Kotlova ER, Novikov AV, Shavarda AL, Artemenko KA, Zubarev RA,
555 Minibayeva FV (2010) Binding of Sterols Affects Membrane Functioning and Sphingolipid
556 Composition in Wheat Roots. *Biochemistry* 75:554-561.
557 <https://doi.org/10.1134/S0006297910050032>.

558

559 Villarreal-Gómez LJ, Soria-Mercado IE, Guerra-Rivas G, Ayala-Sánchez NE (2011)
560 Actividad anticancerígena y antibacteriana de macroalgas y bacterias asociadas a su
561 superficie. *Rev Biol Mar Oceanogr* 45:267-275.
562 <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572010000200008>

563 Villasenor IM, Angelada J, Canlas AP, Echegoyen D (2002) Bioactivity studies on beta
564 sitosterol and its glucoside. *Phytother Res* 16:417-421. <https://doi.org/10.1002/ptr.910>

565

566 Vivancos M, Moreno JJ (2005) β -Sitosterol modulates antioxidant enzyme response in RAW
567 264.7 macrophages. *Free Radical Biol Med* 39:91-97.

<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.02.025>

Volkman JK (2003) Sterols in microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:495–506.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00253-002-1172-8>

Wienckle C, Amsler CD, Clayton MN (2014) Macroalgae. In: De Broyer C, Koubbi P, Griffiths HJ, Raymond B, Udekem d'Acoz Cd', Van de Putte, AP, Danis B, David B, Grant S, Gutt J, Held C, Hosie G, Huettmann F, Post A, Ropert-Coudert Y (eds) *Biogeographic Atlas of the Southern Ocean*, 1st edn. Scientific Committee on Antarctic Research, Cambridge, pp 66-73.

Wiencke C, Clayton MN (2002) *Antarctic Seaweeds*. A.R.G. Gantner-Verlag: Lichtenstein, pp 1-239.

Young RM, Von Salm JL, Amsler MO, Lopes-Bautista J, Amsler CD, McClintock JB, Baker BJ (2013) Site-Specific Variability in the Chemical Diversity of the Antarctic Red Alga *Plocamium cartilagineum*. *Mar Drugs* 11:2126-2139. <https://doi.org/10.3390/md11062126>

Table 1. Macroalgae collected at different sites of King George Island (Antarctica)

Species	Site and date of collection
<i>P. decipiens</i>	Demay Point (62° 13' 13.93" S , 58° 26' 17.85" W) January 27, 2012
<i>P. cartilagineum</i>	Demay Point (62° 13' 13.93" S, 58° 26' 17.85" W) January 30, 2012
<i>I. cordata</i>	Demay Point (62° 13' 13.93" S, 58° 26' 17.85" W) January 27, 2012
<i>P. endiviifolia</i>	Punta Plaza (62° 13' 21.01" S, 58° 26' 36.59" W) January 27, 2012

Table 2. Total sterol concentrations quantified in *Palmaria decipiens*, *Plocamium cartilagineum*, *Iridaea cordata* and *Pyropia endiviifolia*.

Sterol (mg kg ⁻¹ DW ± SD)	Red Algae			
	<i>P. decipiens</i>	<i>P. cartilagineum</i>	<i>I. cordata</i>	<i>P. endiviifolia</i>
Cholesterol	518.74 ± 0.68 ^a	973.76 ± 2.34 ^b	3195.69 ± 2.95 ^c	216.32 ± 1.76 ^d
Brassicasterol	337.43 ± 0.04 ^a	65.34 ± 0.77 ^b	-	68.56 ± 0.42 ^{bc}
Campesterol	277.78 ± 0.24 ^a	68.39 ± 0.31 ^b	131.02 ± 0.09 ^c	64.95 ± 0.30 ^{bd}
Stigmasterol	393.20 ± 0.21 ^a	68.35 ± 0.31 ^b	198.69 ± 0.09 ^c	81.35 ± 0.43 ^d
β -sitosterol	654.18 ± 0.23 ^a	131.42 ± 0.91 ^b	302.35 ± 0.68 ^c	154.56 ± 0.48 ^d
Fucosterol	286.18 ± 0.07 ^a	111.99 ± 0.99 ^b	157.11 ± 0.04 ^c	57.67 ± 0.09 ^d
Total Sterols	2467.50 ^a	1419.24 ^b	3984.86 ^c	643.42 ^d

Results in mg kg⁻¹ of dry weight =DW (values represent the mean and standard deviation for n = 3)

*Means followed by equal letters do not differ significantly by the Tukey test, at 5 % probability

Table 3. Relative sterol contents from the literature and the present work found in red macroalgae

Species	Sterols (%)								Technique	Reference
	Chol	Bras	Ergo	Camp	Stig	β -sit	Fuc	O. c.		
<i>P. decipiens</i>	21.0	13.7	n.q.	11.3	15.9	26.5	11.6	-	GC-MS	This work
	1.3	-	-	1.6*		-	1.5	92.6	HPLC-MS	Sánchez-Machado et al. (2004)
<i>P. cartilagineum</i>	68.6	4.6	n.q.	4.8	4.8	9.3	7.9	-	GC-MS	This work
	53.5	-	-	11.2*		-	31	4.1	HPLC-DAD	Lopes et al. (2011)
<i>I. cordata</i>	80.2	n.q.	n.q.	3.3	5.0	7.6	3.9	-	GC-MS	This work
<i>P. endiviifolia</i>	33.6	10.7	n.q.	10.1	12.6	24.0	9.0	-	GC-MS	This work

-: not present, n.q.: not quantified, * compounds quantified together, Chol: cholesterol, Bras: brassicasterol, Erg: Ergosterol, Camp: campesterol, Stig: stigmasterol, β -Sit: β -Sitosterol and Fuc: fucosterol, O.c. other compounds

635 Table 4. Relative sterol contents from the literature in red macroalgae determined by GC-MS

Species	Sterols (%)								Reference
	Chol	Bras	Erg	Camp	Stig	β -sit	Fuc	O.c.	
<i>Solieria chordalis</i>	80.3	4	-	3.2	-	-	4.4	8.1	Kendel et al. (2015)
<i>Chondria collinsiana</i>	72.9	-	-	-	4.6	12.7	-	9.8	Al Easa et al. (1995)
<i>Digenea simplex</i>	30.2	11.1	-	3.8	9.3	11.9	-	33.7	Al Easa et al. (1995)
<i>Laurencia paniculata</i>	100	-	-	-	-	-	-	-	Al Easa et al. (1995)
<i>Laurencia papillosa</i>	68.7	-	-	-	31.3	-	-	-	Al Easa et al. (1995)
<i>Polysiphonia brodiae</i>	32.0	-	9.3	-	9.3	14	-	35.4	Al Easa et al. (1995)
<i>Polysiphonia ferulacea</i>	47.5	8.9	4	-	7	9.7	-	22.9	Al Easa et al. (1995)
<i>Spyridia filamentosa</i>	23.8	-	8.2	-	13.7	30.5	-	23.8	Al Easa et al. (1995)
<i>Chondria armata</i>	12.0	-	-	-	-	-	-	88	Govenkar and Wahidulla (2000)
<i>Grateloupia turuturu</i>	87.7	1.3	-	-	-	-	1.7	9.3	Kendel et al. (2013)

636 -: not reported, Chol: cholesterol, Bras: brassicasterol, Erg: Ergosterol, Camp: campesterol, Stig: stigmasterol, β -Sit: β -Sitosterol and Fuc:
637 fucosterol, O.c. other compounds

638

639

640

641

642

643

644

645

646 Table 5. Relative sterol contents from the literature in red macroalgae determined by HPLC

Species	Sterols (%)								Detector	Reference
	Chol	Bras	Erg	Camp	Stig	β-sit	Fuc	O. c.		
<i>Porphyra dentata</i>	15.0	-	-	30.0	-	55.0	-	-	ELSD	Kazłowska et al. (2013)
<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	34.1	-	-	46.6*	-	-	13.9	5.4	DAD	Lopes et al. (2011)
<i>Asparagopsis armata</i>	52.1	-	-	-	-	3.7	31.4	12.8	DAD	Lopes et al. (2011)
<i>Osmundea pinnatifida</i>	70.3	-	-	6.3*	-	1.5	16.3	5.6	DAD	Lopes et al. (2011)
<i>Schizymenia dubyi</i>	88.4	-	-	-	-	7.2	4.4	-	DAD	Lopes et al. (2011)
<i>Porphyra</i> sp.	8.6	-	-	2.3*	-	-	< 1	88.4	MS	Lopes et al. (2011)

647 -: not detect, *compounds quantified together, Chol: cholesterol, Bras: brassicasterol, Erg: Ergosterol, Camp: campesterol, Stig: stigmasterol,
648 β-Sito: β-Sitosterol and Fuco: fucosterol, O. c: other compounds

649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659

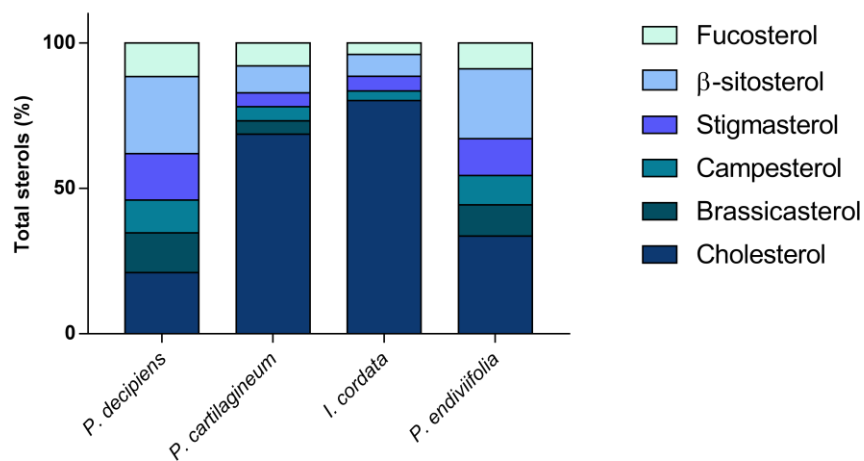


Figure 1. Percentages of fucosterol, β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, brassicasterol and cholesterol in relation to the total content of sterols.

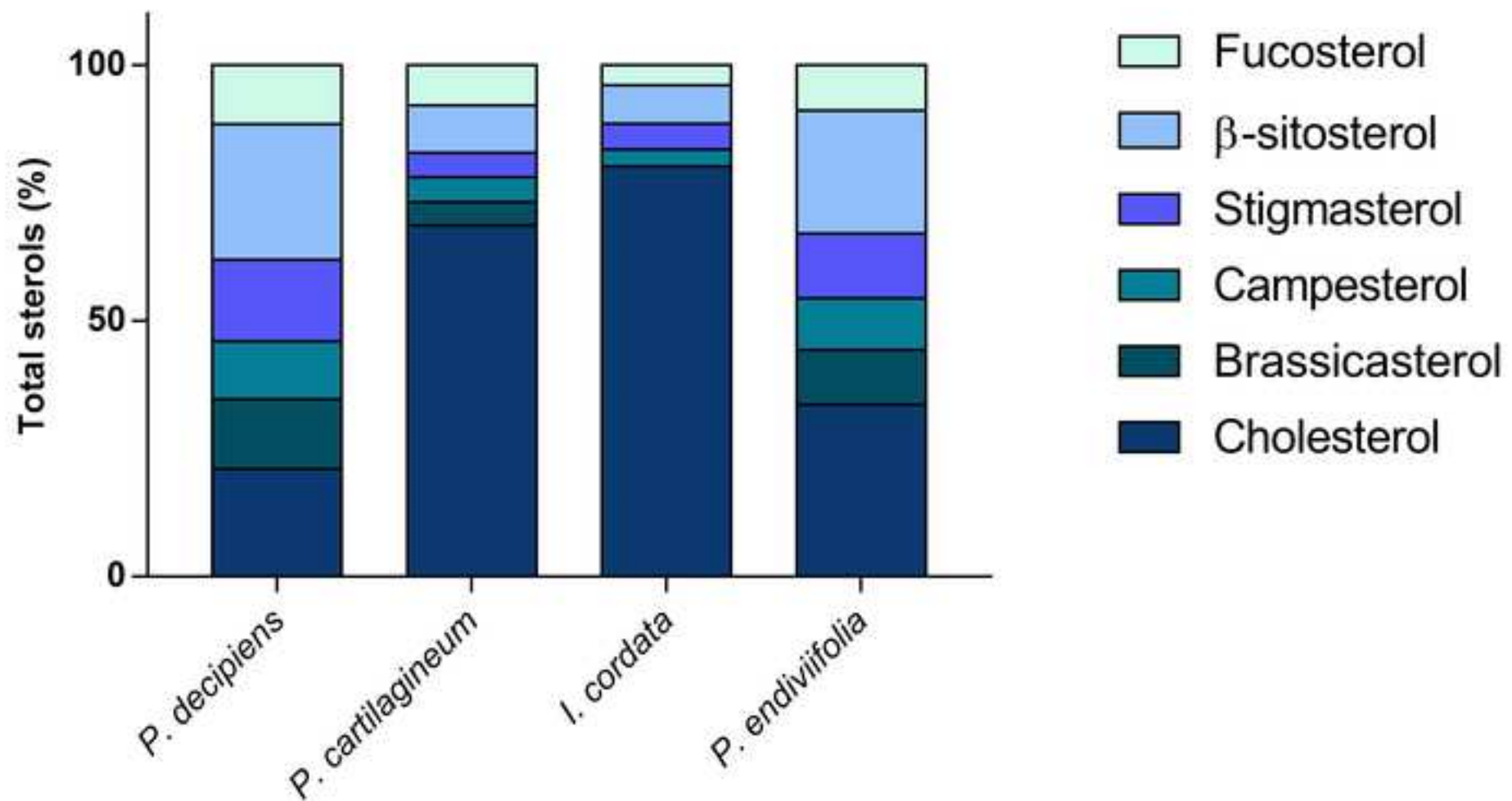


Table 1. Macroalgae collected at different sites of King George Island (Antarctica)

Species	Site and date of collection
<i>P. decipiens</i>	Demay Point (62° 13' 13.93" S , 58° 26' 17.85" W) January 27, 2012
<i>P. cartilagineum</i>	Demay Point (62° 13' 13.93" S, 58° 26' 17.85" W) January 30, 2012
<i>I. cordata</i>	Demay Point (62° 13' 13.93" S, 58° 26' 17.85" W) January 27, 2012
<i>P. endiviifolia</i>	Punta Plaza (62° 13' 21.01" S, 58° 26' 36.59" W) January 27, 2012

Table 2. Total sterol concentrations quantified in *Palmaria decipiens*, *Plocamium cartilagineum*, *Iridaea cordata* and *Pyropia endiviifolia*.

Sterol (mg kg ⁻¹ DW ± SD)	Red Algae			
	<i>P. decipiens</i>	<i>P. cartilagineum</i>	<i>I. cordata</i>	<i>P. endiviifolia</i>
Cholesterol	518.74 ± 0.68 ^a	973.76 ± 2.34 ^b	3195.69 ± 2.95 ^c	216.32 ± 1.76 ^d
Brassicasterol	337.43 ± 0.04 ^a	65.34 ± 0.77 ^b	-	68.56 ± 0.42 ^{bc}
Campesterol	277.78 ± 0.24 ^a	68.39 ± 0.31 ^b	131.02 ± 0.09 ^c	64.95 ± 0.30 ^{bd}
Stigmasterol	393.20 ± 0.21 ^a	68.35 ± 0.31 ^b	198.69 ± 0.09 ^c	81.35 ± 0.43 ^d
β -sitosterol	654.18 ± 0.23 ^a	131.42 ± 0.91 ^b	302.35 ± 0.68 ^c	154.56 ± 0.48 ^d
Fucosterol	286.18 ± 0.07 ^a	111.99 ± 0.99 ^b	157.11 ± 0.04 ^c	57.67 ± 0.09 ^d
Total Sterols	2467.50 ^a	1419.24 ^b	3984.86 ^c	643.42 ^d

Results in mg kg⁻¹ of dry weight =DW (values represent the mean and standard deviation for n = 3)

*Means followed by equal letters do not differ significantly by the Tukey test, at 5 % probability

Table 3. Relative sterol contents from the literature and the present work found in red macroalgae

Species	Sterols (%)								Technique	Reference
	Chol	Bras	Ergo	Camp	Stig	β -sit	Fuc	O. c.		
<i>P. decipiens</i>	21.0	13.7	n.q.	11.3	15.9	26.5	11.6	-	GC-MS	This work
	1.3	-	-	1.6*		-	1.5	92.6	HPLC-MS	Sánchez-Machado et al. (2004)
<i>P. cartilagineum</i>	68.6	4.6	n.q.	4.8	4.8	9.3	7.9	-	GC-MS	This work
	53.5	-	-	11.2*		-	31	4.1	HPLC-DAD	Lopes et al. (2011)
<i>I. cordata</i>	80.2	n.q.	n.q.	3.3	5.0	7.6	3.9	-	GC-MS	This work
<i>P. endiviifolia</i>	33.6	10.7	n.q.	10.1	12.6	24.0	9.0	-	GC-MS	This work

-: not present, n.q.: not quantified, * compounds quantified together, Chol: cholesterol, Bras: brassicasterol, Erg: Ergosterol, Camp: campesterol, Stig: stigmasterol, β -Sit: β -Sitosterol and Fuc: fucosterol, O.c. other compounds

Table 4. Relative sterol contents from the literature in red macroalgae determined by GC-MS

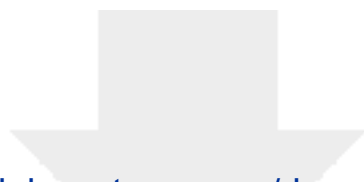
Species	Sterols (%)								Reference
	Chol	Bras	Erg	Camp	Stig	β -sit	Fuc	O.c.	
<i>Solieria chordalis</i>	80.3	4	-	3.2	-	-	4.4	8.1	Kendel et al. (2015)
<i>Chondria collinsiana</i>	72.9	-	-	-	4.6	12.7	-	9.8	Al Easa et al. (1995)
<i>Digenea simplex</i>	30.2	11.1	-	3.8	9.3	11.9	-	33.7	Al Easa et al. (1995)
<i>Laurencia paniculata</i>	100	-	-	-	-	-	-	-	Al Easa et al. (1995)
<i>Laurencia papillosa</i>	68.7	-	-	-	31.3	-	-	-	Al Easa et al. (1995)
<i>Polysiphonia brodiae</i>	32.0	-	9.3	-	9.3	14	-	35.4	Al Easa et al. (1995)
<i>Polysiphonia ferulacea</i>	47.5	8.9	4	-	7	9.7	-	22.9	Al Easa et al. (1995)
<i>Spyridia filamentosa</i>	23.8	-	8.2	-	13.7	30.5	-	23.8	Al Easa et al. (1995)
<i>Chondria armata</i>	12.0	-	-	-	-	-	-	88	Govenkar and Wahidulla (2000)
<i>Grateloupia turuturu</i>	87.7	1.3	-	-	-	-	1.7	9.3	Kendel et al. (2013)

-: not reported, Chol: cholesterol, Bras: brassicasterol, Erg: Ergosterol, Camp: campesterol, Stig: stigmasterol, β -Sit: β -Sitosterol and Fuc: fucosterol, O.c. other compounds

Table 5. Relative sterol contents from the literature in red macroalgae determined by HPLC

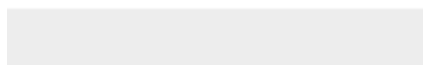
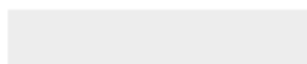
Species	Sterols (%)								Detector	Reference
	Chol	Bras	Erg	Camp	Stig	β -sit	Fuc	O. c.		
<i>Porphyra dentata</i>	15.0	-	-	30.0	-	55.0	-	-	ELSD	Kazłowska et al. (2013)
<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	34.1	-	-	46.6*	-	-	13.9	5.4	DAD	Lopes et al. (2011)
<i>Asparagopsis armata</i>	52.1	-	-	-	-	3.7	31.4	12.8	DAD	Lopes et al. (2011)
<i>Osmundea pinnatifida</i>	70.3	-	-	6.3*	-	1.5	16.3	5.6	DAD	Lopes et al. (2011)
<i>Schizymenia dubyi</i>	88.4	-	-	-	-	7.2	4.4	-	DAD	Lopes et al. (2011)
<i>Porphyra</i> sp.	8.6	-	-	2.3*	-	-	< 1	88.4	MS	Lopes et al. (2011)

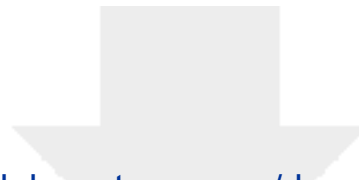
-: not detect, *compounds quantified together, Chol: cholesterol, Bras: brassicasterol, Erg: Ergosterol, Camp: campesterol, Stig: stigmasterol, β -Sito: β -Sitosterol and Fuco: fucosterol, O. c: other compounds



[Click here to access/download](#)

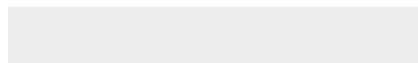
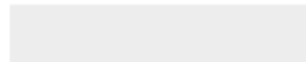
Electronic Supplementary Material
ESM_1.jpg

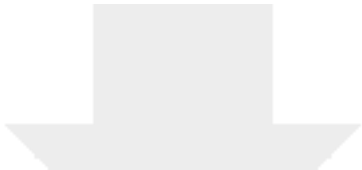




[Click here to access/download](#)

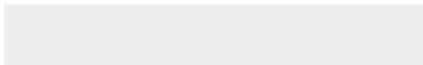
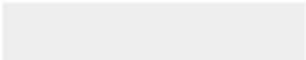
Electronic Supplementary Material
ESM_2.docx





[Click here to access/download](#)

Electronic Supplementary Material
Cover letter.docx



Brazilian Journal of Microbiology

Bioactivity and composition of lipophilic metabolites extracted from Antarctic macroalgae

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	BJMI-D-20-00873R1	
Full Title:	Bioactivity and composition of lipophilic metabolites extracted from Antarctic macroalgae	
Article Type:	Research Paper	
Funding Information:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior	Ms. Lucas M. Berneira
Abstract:	Macroalgae comprise a vast group of aquatic organisms known for their richness in phytochemicals. In this sense, the lipophilic profile from five Antarctic seaweeds was characterized by chromatographic and spectroscopic analysis and had their antioxidant and antimicrobial potential evaluated. Results showed that the specimens were composed of 31 lipophilic components mainly divided into fatty acids (48.73 ± 0.77 — 331.91 ± 10.79 mg.Kg⁻¹), sterols (14.74 ± 0.74 — 321.25 ± 30.13 mg.Kg⁻¹) and alcohols (13.07 ± 0.04 — 91.87 ± 30.07 mg.Kg⁻¹). Moreover, <i>Desmarestia confervoides</i> had a noticeable antioxidant activity inhibiting $86.03 \pm 1.47\%$ of the DPPH radical at 1 mg.mL⁻¹. Antimicrobial evaluation showed that extracts from <i>Ulva intestinalis</i>, <i>Curdiea racovitzae</i> and <i>Adenocystis utricularis</i> inhibited the growth of <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922), <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) and <i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028) from concentrations of 1.5 to 6 mg.mL⁻¹. Therefore, the evaluated brown, red and green macroalgae were constituted of several phytochemicals with promising biological activities that could be applied by pharmaceutical, biotechnological and food industries.	
Corresponding Author:	Claudio Martin Pereira de Pereira University Federal of Pelotas Pelotas, Rio Grande do Sul BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	University Federal of Pelotas	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Lucas M. Berneira	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Lucas M. Berneira Ivandra I. de Santi Caroline C. da Silva Dalila Venzke Pio Colepicolo Rodrigo de A. Vaucher Marco A. Z. dos Santos Claudio Martin Pereira de Pereira	
Order of Authors Secondary Information:		
Author Comments:	The authors have no additional comments to be sent to the publication office.	
Response to Reviewers:	Dear editor, We would like to thank you and the reviewers for the time spent to evaluate this	

manuscript, which we have modified to address your concerns. We hope that this version of the manuscript is now suitable for publication in Brazilian Journal of Microbiology. The modifications are indicated below.

Sincerely,
The authors.

Detailed Response to Reviewers

The manuscript was revised and modifications in the text were made. The manuscript had the language carefully revised in order to improve the grammar and readability.

Reviewer #1: Please add to Acknowledgements: Coordination of Improvement of Personal Higher Education—Brazil (CAPES—Finance Code 001); and Research Support Foundation of the Rio Grande do Sul State (FAPERGS) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) financial codes;
Author's response: Financial codes from CAPES, FAPERGS and CNPq were added to the manuscript

Reviewer #1: Line 54. Replace "DPPH" by "2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)";
Author's response: The expression was adjusted according to the suggestion of the reviewer.

Reviewer #1: Line 76. Replace "Antarctic regions" by "Antarctic region";
Author's response: The expression was adjusted according to the suggestion of the reviewer.

Reviewer #1: Line 82. Remove "secondary";
Author's response: The expression was adjusted according to the suggestion of the reviewer.

Reviewer #1: Line 90. Replace "fight" by "minimize";
Author's response: The expression was adjusted according to the suggestion of the reviewer.

Reviewer #1: Line 91. Remove "which is increasing at alarming rates";
Author's response: The expression was removed.

Reviewer #1: Line 91. Replace "Given this" by "Due the";
Author's response: The expression was adjusted according to the suggestion of the reviewer.

Reviewer #1: Line 94. Rebuild "Therefore, extracts from macroalgae could be important tools in order to screen their chemical potential and further identify bioactive compounds"
Author's response: The sentence was adjusted to "In this sense, macroalgae extracts

could provide important bioactive compounds to be used in biotechnological and pharmaceutical areas, for instance”.

Reviewer #1: Line 103. Please replace "lipophilic constitution". Add each class of analyzed components.

Author's response: The sentence was adjusted including each class of the analyzed components.

Reviewer #1: Line 108. Verified if the current work was part of any specific expedition. If yes, please add the expedition name to manuscript;

Author's response: The expedition name was added to the manuscript.

Reviewer #1: Line 143. Please add mass spectrometer parameters;

Author's response: Mass spectrometer parameters were added to the manuscript as it follows: “Mass spectrometer operated using an electron ionization at 70 eV with the ion source scanning from m/z 30 to m/z 550. Identification of compounds was made using a NIST08s spectral library”.

Reviewer #3: Page 5, Line 98: Replace (.) with (,)

Author's response: The change suggested by the reviewer was made.

Bioactivity and composition of lipophilic metabolites extracted from Antarctic macroalgae

Lucas M. Berneira^a; Ivandra I. de Santi^a; Caroline C. da Silva^a; Dalila Venzke^a; Pio Colepicolo^b; Rodrigo de A. Vaucher^c; Marco A. Z. dos Santos^a; Claudio M. P. de Pereira^{a*}

^a Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Lipidomic and Bio-Organic Laboratory, Bioforensic Research Group, Federal University of Pelotas, Eliseu Maciel St., s/n, 96900-010, Pelotas, RS, Brazil

^b Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, State University of São Paulo, Lineu Prestes Av., 748, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

^c Center of Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Biochemistry Research and Molecular Biology of Microorganisms Laboratory, Federal University of Pelotas, Eliseu Maciel St., s/n, 96900-010, Pelotas, RS, Brazil

*Corresponding Author: lahbbioufpel@gmail.com

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful for the logistic support provided by the Brazilian Antarctic Program and to the financial support by the Coordination for Improvement of Higher Level Personnel (CAPES - 99999.002378/2015-9), Research Support Foundation of the Rio Grande do Sul State (FAPERGS - 2010/50193-1) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq - 407588/2013-2).

Authors' contributions

Conceptualization: Dalila Venzke, Pio Colepicolo; Methodology: Ivandra S. de Santi; Formal analysis and investigation: Marco A. Z. ds Santos, Rodrigo de A. Vaucher; Writing - original draft preparation: Lucas M. Berneira; Writing - review and editing: Caroline C. da Silva; Funding acquisition: Claudio M. P. Pereira.

Bioactivity and composition of lipophilic metabolites extracted from Antarctic macroalgae

Abstract

Macroalgae comprise a vast group of aquatic organisms known for their richness in phytochemicals. In this sense, the lipophilic profile from five Antarctic seaweeds was characterized by chromatographic and spectroscopic analysis and had their antioxidant and antimicrobial potential evaluated. Results showed that the specimens were composed of 31 lipophilic components mainly divided into fatty acids (48.73 ± 0.77 — 331.91 ± 10.79 mg.Kg⁻¹), sterols (14.74 ± 0.74 — 321.25 ± 30.13 mg.Kg⁻¹) and alcohols (13.07 ± 0.04 — 91.87 ± 30.07 mg.Kg⁻¹). Moreover, *Desmarestia confervoides* had a noticeable antioxidant activity inhibiting $86.03 \pm 1.47\%$ of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical at 1 mg.mL⁻¹. Antimicrobial evaluation showed that extracts from *Ulva intestinalis*, *Curdiea racovitzae* and *Adenocystis utricularis* inhibited the growth of *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) from concentrations of 1.5 to 6 mg.mL⁻¹. Therefore, the evaluated brown, red and green macroalgae were constituted of several phytochemicals with promising biological activities that could be applied by pharmaceutical, biotechnological and food industries.

Key-words: Lipophilic Extract; Bioactive Compounds; Macroalgae; Antioxidant Activity; Antimicrobial Activity.

1. Introduction

The marine environment is known for its biodiversity and for being a source of more than 25,000 natural products¹. Among photosynthetic organisms that inhabit aquatic ecosystems are macroalgae which can be divided into green, brown and red algae depending on morphological and biochemical aspects^{2,3}. Given their biological, chemical and breeding properties, seaweeds are becoming important marine resources as harvesting grows approximately 15% per year with capture or aquaculture reaching as much as 25 million tons in 2014^{4,5}.

The high degree of adaptation of macroalgae led these organisms to inhabit several environments that include tropical, subtropical, polar and Antarctic region^{4,6,7}. In complex habitats that include the Antarctic Peninsula, seaweeds are subjected to several abiotic parameters such as low water temperature, restricted nutrient availability, high exposure to ultraviolet radiation, limited photoperiod and high water salinity^{3,8}. The extreme environmental conditions influence aquatic organisms to develop defense and survival strategies including the activation of biochemical processes related to the production of metabolites⁹.

It is known that secondary metabolites found in aquatic ecosystems have unique structural and chemical moieties that are not commonly found in natural products from terrestrial plants¹. According to previous reports, approximately 15,000 secondary metabolites have been identified in macroalgae, which include, for instance, fatty acids (FAs), sterols, polysaccharides, aminoacids, flavonoids, and terpenoids^{3,8}. In this sense, seaweeds comprehend an important reserve of possible bioactive compounds that could be further applied for antimicrobial or antioxidant use².

The search for novel bioactive compounds is important to minimize antimicrobial resistance. Due the increasing demand for novel therapeutic drugs, there is a growing interest in metabolites found in marine organisms as several algae species have shown to produce bactericidal or bacteriostatic substances. In this sense, macroalgae extracts could provide important bioactive compounds to be used in biotechnological and pharmaceutical areas, for instance ¹.

As it can be observed, macroalgae comprise an almost unlimited reserve of potential biochemical compounds that could be employed in several industrial applications. It is worth noting that, despite more than 10,000 species of seaweeds have been identified, only few representatives were chemically characterized in order to screen for molecules with potential applications. Over the past years, our research group have analyzed lipophilic components of sub-Antarctic or Antarctic macroalgae including FAs ^{4,6} and sterols ¹⁰ and successfully indicated their biological applications ¹¹. In this sense, the aims of this work were to evaluate fatty acids, sterols and carboxylic, dicarboxylic and tricarboxylic acid among other lipophilic constituents from five extracts of Antarctic macroalgae and to evaluate their antioxidant and antibacterial activity.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling

Approximately 5 to 10 individuals of each species of brown, red and green Antarctic macroalgae were manually collected in the eulittoral or infralittoral zone in several locations of the Antarctic Peninsula between November and December of 2015 (**Table 1**) as part of the XXXIV Operação Antártica expedition. Samples were washed with seawater and further cleaned with distilled water in order to remove impurities,

microorganisms and salt. After morphological identification, seaweeds were lyophilized, milled and stored within hermetic dark bags at -20 °C before analyses.

[insert Table 1]

2.2. Chemicals and Materials

Pyridine, *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl-hydrate (DPPH), methyl nonedecanoate, cholesterol and 1-decanol were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, USA) while *n*-hexane and methanol were obtained from J.T. Baker (Radnor, USA). All other solvents and reactants were analytical grade.

2.3. Extraction

The lipophilic fraction of macroalgae (5 g) was extracted using *n*-hexane by means of a Soxhlet apparatus for 6 h after the sample was soaked with solvent overnight. Subsequently, the lipophilic extract was dried under reduced pressure. The procedure was performed in triplicate (*n*=3) and followed the modified method of Santos et al. (2015) replacing dichloromethane for *n*-hexane.

2.4. Chemical Composition

2.4.1. Hydrolysis and Derivatization

Briefly, 10 mg of the lipophilic extract and 10 mL of a 0.5 M solution of sodium hydroxide in methanol: water (50:50, v/v) were constantly mixed and refluxed for 1 h. Afterwards, the system was cooled and acidified to a pH of 2 by the gradual addition of a 1 M solution of hydrochloric acid. Furthermore, samples were extracted three times

with 5 mL of dichloromethane. Lipophilic layers were combined and dried under reduced pressure. The hydrolyzed extracts were reconstituted in 100 μ L of chloroform and further derivatized with 100 μ L of *N*-methyl-*N*-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and 100 μ L of pyridine under 70 $^{\circ}$ C for 30 min. Procedures were performed in triplicate ($n=3$) and followed the method of Santos et al. (2015).

2.4.2. Chromatographic Analysis

Chromatographic analysis followed the method of Santos et al. (2015) and was performed in a GC-MS model QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) followed by the injection of 1 μ L in split mode (1:33) of the derivatized material into a Rtx-5MS capillary column (30m x 0.25mm x 0.25 μ m; Restek, Bellefonte, USA) with a gas flow of helium of 1.50 mL.min⁻¹. The injection port and interface operated at 250 $^{\circ}$ C and 290 $^{\circ}$ C, respectively. Initial oven temperature was set at 80 $^{\circ}$ C maintaining for 5 min increasing 4 $^{\circ}$ C.min⁻¹ to 260 $^{\circ}$ C and growing 2 $^{\circ}$ C.min⁻¹ until the final oven temperature of 285 $^{\circ}$ C that was kept for 8 min.

Mass spectrometer operated using an electron ionization at 70 eV with the ion source scanning from m/z 30 to m/z 550. Identification of compounds was made using a NIST08s spectral library. Quantitation followed the method of Santos et al. (2015) and was performed using pure references standards as representatives from the major lipophilic families (methyl nonadecanoate, cholesterol and 1-decanol) in solutions of 1 mg.mL⁻¹, 0.500 mg.mL⁻¹, 0.250 mg.mL⁻¹, 0.125 mg.mL⁻¹, 0.625 mg.mL⁻¹ and 0.312 mg.mL⁻¹ in *n*-hexane injected in triplicate ($n=3$).

2.4.3. Spectroscopic Analysis

Approximately 10 μL of the lipophilic extracts were analyzed using an infrared spectrometer coupled to Attenuated Total Reflection with Fourier Transform model Shimadzu Prestige 21 (Shimadzu, Kyoto, Japan) analyzing the samples from 4000 cm^{-1} to 600 cm^{-1} with a resolution of 4 cm^{-1} .

2.5. Antioxidant Activity

Concentrations of 1 mg.mL^{-1} , 0.500 mg.mL^{-1} , 0.250 mg.mL^{-1} and 0.125 mg.mL^{-1} of lipophilic extracts were evaluated for antioxidant activity by mixing them with $300\text{ }\mu\text{L}$ of DPPH radical methanolic solution (0.394 mg.mL^{-1}) and 3 mL of methanol. Samples were incubated at room temperature for 15 min in the dark and analyzed by spectrophotometric means (UV-M51; Bel, Piracicaba, Brazil) at 517 nm . Positive controls were performed using ascorbic acid at the same concentrations of the tested samples. An analytical blank using $300\text{ }\mu\text{L}$ of DPPH radical mixed with 2.7 mL of methanol was also performed. All experiments were made in triplicate ($n=3$) and followed the method of Pellati et al. (2004). Inhibition of the DPPH radical at different concentrations of the lipophilic extracts was measured by **Equation 1**.

$$\% \text{ Inhibition} = \left[\frac{A_{\text{DPPH}} - (A_{\text{Extract}} - A_{\text{Blank}})}{A_{\text{DPPH}}} \right] \times 100(1)$$

Where A_{DPPH} is the absorbance of the DPPH radical without samples, A_{Extract} is the absorbance of lipophilic extracts mixed with DPPH radical and A_{Blank} is the absorbance of methanol.

2.6. Antibacterial Activity

2.6.1. Test Organisms

Antimicrobial activity was performed using gram-positive standard strains *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) as well as gram-negative standard strains *Escherichia coli* (ATCC 25922) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). Microorganisms were provided by the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ). The evaluated strains were maintained in Mueller-Hinton agar at 4 °C and reactivated prior to antimicrobial evaluation.

2.6.2. Minimum Inhibitory Concentration

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined according to the broth microdilution method following Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2017) guidelines. Firstly, *n*-hexane extracts from Antarctic macroalgae were diluted in brain-heart infusion (BHI) broth from concentrations that ranged from 6 mg.mL⁻¹ to 0.0078 mg.mL⁻¹ in 5% of ethanol. As negative control, 100 µL of BHI broth were used while a positive control was made using 50 µL of bacterial suspension and 50 µL of BHI broth.

Microorganisms were cultured in BHI broth and standardized to 0.5 in the McFarland scale resulting in an optical density between 0.08 and 0.1 at 630 nm. Afterwards, 50 µL of cultured samples were diluted in 4,950 µL of BHI broth and 50 µL of the suspensions were inserted in wells resulting in a final concentration of microorganisms of 3.10⁴ CFU.mL⁻¹. MIC was made in triplicates (*n*=3) and plates were incubated at 37 °C for 24 h. Subsequently, 20 µL of 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (0.5%, w/v) was placed in the wells that were further incubated for 20 min at 37 °C. Finally, bacterial growth was evaluated by color development.

2.6.3. Minimum Microbicidal Concentration

Samples that had antimicrobial activity had their Minimum Microbicidal Concentration (MMC) determined. Briefly, 5 μ L aliquots were pealed in Mueller-Hinton agar plates and incubated at 37 °C for 24 h. Afterwards, presence or absence of bacterial growth was evaluated for the determination of bacteriostatic or bactericidal activity. The experiments were made in triplicate ($n=3$).

2.7. Statistical Analysis

Two-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by Tukey's Test ($p<0.05$) were applied to determine significant differences among the constituents of the samples using Graphpad software version 7 (La Jolla, USA). Principal Component Analysis (PCA) was used to evaluate similarities in the lipophilic composition of the algal extracts employing Minitab software version 17 (State College, USA).

3. Results

3.1. Chemical Evaluation

Lipophilic yields of the studied Antarctic macroalgae (**Table 2**) were generally in the range of 0.189 ± 0.005 to $0.356 \pm 0.038\%$ DW in brown seaweeds, 0.134 ± 0.005 to $0.138 \pm 0.003\%$ DW in red seaweeds and $0.187 \pm 0.021\%$ DW in *U. intestinalis* (green seaweed). Generally, brown macroalgae had the highest amounts of extracted lipophilic compounds reaching as much as $0.356 \pm 0.038\%$ DW in *D. confervoides*. On the other hand, the lowest values of lipophilic yield was observed in *M. manginii* that had $0.134 \pm 0.005\%$ DW.

[insert Table 2]

Evaluation of chemical composition of the lipophilic extracts from Antarctic macroalgae (**Table 3**) showed that combined the macroalgae had 31 distinct compounds that could be distributed as FAs, alcohols, sterols, ketones, aldehydes, hydrocarbons and other chemical classes. The highest number of compounds was found in Ochrophyta representatives as *D. confervoides* and *A. utricularis* had 24 and 23 constituents, respectively, while *U. intestinalis* had the lowest variety reaching 19 compounds.

[insert Table 3]

As it can be observed in **Table 3**, *D. confervoides* had most compounds found in higher concentrations compared to the other analyzed specimens. Generally, 2-ethylhexanoic acid (11.12 ± 5.48 — 49.65 ± 6.32 mg.kg⁻¹), hexadecanoic acid (7.92 ± 0.09 — 49.01 ± 6.18 mg.kg⁻¹), 2-butoxyethanol (7.48 ± 0.12 — 56.37 ± 26.20 mg.kg⁻¹) and fucosterol (nd— 282.96 ± 29.02 mg.kg⁻¹) were the constituents found in noticeable concentrations in the samples. The presence of these compounds made the lipophilic extract dominated by FAs (48.73 ± 0.77 — 331.91 ± 10.79 mg.kg⁻¹), sterols (14.74 ± 0.74 — 321.25 ± 30.13 mg.kg⁻¹) and alcohols (13.07 ± 0.04 — 51.87 ± 30.07 mg.kg⁻¹).

Spectroscopic analysis of the lipophilic extracts (**Table 1S**) showed that samples were mainly composed of vibrations that corresponded to aliphatic carbon-hydrogen bonds (2963 — 2855 cm⁻¹, stretching; 1457 — 1371 cm⁻¹, bending), carbonyl groups (1742 — 1715 cm⁻¹) and carbon-oxygen bonds (1230 — 1203 cm⁻¹). Moreover, extracts from *A. utricularis* and *D. confervoides* had unsaturation (3009 — 3004 cm⁻¹) while *M. manginii* and *U. intestinalis* had hydroxyl groups (3393 — 3357 cm⁻¹). IR Spectroscopy spectra and GC-MS chromatograms of the lipophilic extracts can be seen in the *Supplementary Information* section.

3.2. Antioxidant Activity

Evaluation of antioxidant activity of the lipophilic extracts (**Fig 1**) showed that *D. confervoides* inhibited $86.03 \pm 1.47\%$ of the DPPH radical at 1 mg.mL^{-1} maintaining similar antioxidant potential at 0.500 mg.mL^{-1} and 0.250 mg.mL^{-1} , which inhibited $83.79 \pm 2.12\%$ and $80.40 \pm 1.94\%$, respectively. Lower antioxidant capacity of the lipophilic extract was observed at 0.125 mg.mL^{-1} that had $63.39 \pm 0.49\%$ of inhibition of the DPPH radical. Moreover, comparing the samples with the positive control it can be noted all lipophilic extracts had lower antioxidant activity than ascorbic acid.

[insert Figure 1]

As it can be seen in **Fig 1**, lipophilic extracts from *A. utricularis*, *U. intestinalis*, *M. manginii* and *C. racovitzae* did not have noticeable antioxidant activity compared to *D. confervoides*. Generally, samples inhibited the DPPH radical in major proportions at 1 mg.mL^{-1} reaching $15.21 \pm 1.01\%$, $10.30 \pm 1.26\%$ and $8.70 \pm 0.91\%$ of inhibition for *M. manginii*, *C. racovitzae* and *A. utricularis*, respectively. Although at the maximum tested concentration, *U. intestinalis* had little antioxidant capacity inhibiting $1.80 \pm 0.36\%$ of the DPPH radical. Lipophilic extracts were mostly acted as antioxidants at 0.500 mg.mL^{-1} , however their potential decreased or could not be observed at concentrations lower than 0.250 mg.mL^{-1} .

3.3. Antimicrobial Activity

Antimicrobial evaluation of *n*-hexane extracts from Antarctic macroalgae (**Table 4**) indicated that materials had activity against most tested microorganisms with the

exception of *Enterococcus faecalis*, which had bacterial growth in the evaluated concentrations (0.187 to 6 mg.mL⁻¹). It is worth noting that *D. confervoides* and *M. manginii* extracts did not have antimicrobial activity in the experimental conditions. In general lines, lipophilic extracts had MICs that ranged from 6 to 1.5 mg.mL⁻¹ varying according to the specimen and the microorganism. Furthermore, MMC of the samples indicated that concentrations that inhibited bacterial growth were bacteriostatic to the tested organisms.

[insert Table 4]

According to the results seen in **Table 4**, *Escherichia coli* had its growth inhibited in concentrations above 1.5 mg.mL⁻¹ for *A. utricularis* and *U. intestinalis* extracts while *C. racovitzae* had a MIC of 3 mg.mL⁻¹. In the case of *Staphylococcus aureus*, MIC for *A. utricularis* and *U. intestinalis* extracts were 3 mg.mL⁻¹ while *C. racovitzae* inhibited bacterial growth at 6 mg.mL⁻¹. Similar results were observed for *Salmonella typhimurium* in which lipophilic extracts from *C. racovitzae* and *A. utricularis* had MIC of 6 mg.mL⁻¹ as *U. intestinalis* had antimicrobial activity in concentrations above 3 mg.mL⁻¹.

3.4. Multivariate Analysis

PCA was applied to evaluate chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial activity among the studied specimens (**Fig 2**). For the multivariate analysis, variables that had significant variations including hexadecanoic, eicosatetraenoic and eicosapentaenoic acid as well as fucosterol and 2-butoxyethanol, for instance, were chosen. The obtained loading plot (**Fig 2b**) indicated that most variables clustered in the positive axis of the First Component (PC1) varying from negative to positive axis of the Second Component (PC2). On the other hand, the antimicrobial activity of the tested organisms was found in negative PC1 and PC2.

The resulting score plot (**Fig 2a**) showed that the studied Antarctic macroalgae could be differentiated based on the chosen variables. In general lines, Ochrophyta representatives could be found in the positive axis of PC1 while Rhodophyta and Chlorophyta species were observed in the negative axis of PC1. Based on the results, it can be indicated that the chemical composition and bioactive potential can be associated to the phyla of seaweeds.

[insert Figure 2]

4. Discussion

4.1. Chemical Evaluation

4.1.1. Extractive Yield and Spectroscopic Analysis

Previous reports in the literature indicate that lipophilic extracts of brown, green and red macroalgae had values that ranged from $0.12 \pm 0.01\%$ DW to $1.74 \pm 0.08\%$ DW which agree with the results found in the current work ^{4,9}. Martins et al. (2018) analyzed Antarctic macroalgae having diminished extractive yields in their specimens. Nonetheless, the extracts had antimicrobial and antifungal activities indicating the presence of potential bioactive substances ¹¹.

Spectroscopic evaluation of the lipophilic extracts indicated that samples were mainly possibly constituted of lipid esters as the main vibrations observed in the spectra corresponded to carbon-hydrogen bonds, carbon-oxygen bonds and carbonyl groups ¹⁴. Moreover, hydroxyl groups in the extracts from *M. manginii* and *U. intestinalis* could be associated to unesterified lipids and alcohols seen at **Table 3**. It is worth noting that there is little information regarding the spectroscopic profile of extracts from macroalgae despite its importance to fully characterize the material.

4.1.2. Fatty acids

FAs are among the vast lipid classes found in macroalgae playing roles as membrane constituents (e.g. phosphoglycerides) or as energy storage (e.g. triacylglycerol) generally having higher concentrations than other lipids that include sterols, hydrocarbons and fatty alcohols, for instance ¹⁵⁻¹⁷. In this sense, comparison between the obtained results to the reported in the literature showed that majoritary FAs found in *U. intestinalis* (hexadecanoic, hexadecanoic and octadecenoic acids) were also

determined by Martins et al. (2016) that analyzed the same species collected in the sub-Antarctic region ⁶. Regarding *C. racovitzae* and *A. utricularis*, qualitatively results were similar to the literature, however concentration of PUFAs were diminished in the current work compared to the reported by Pacheco et al. (2018). To the best of our knowledge, *M. manginii* and *D. confervoides* did not have their FA profile previously determined in the literature. Nonetheless, representatives from the same order had similar patterns to the observed in the current study ^{7,19}.

Among the reasons that can explain variations among the obtained results and the reported in the literature are the influences of the Antarctic environment that include limited photoperiod, low water temperature, salinity, nutrient disposal and pH ^{4,20}. These abiotic parameters influence the production of FAs in seaweeds inducing primarily the biosynthesis of PUFAs in order to maintain the integrity of membranes ^{19,20}. Moreover, differences in the extraction approaches may also have influenced the overall results as the extraction of FAs is generally performed using solution of chloroform: methanol ²¹.

4.1.3. Carboxylic, dicarboxylic and tricarboxylic acids

The presence of carboxylic and dicarboxylic acids that include, for instance, hexanedioic, octanedioic, nonanedioic, undecadioic acid have been widely reported as constituents of seaweeds ^{3,4}. These compounds have been associated to biological activities such as antimicrobial action and treatment of skin hyperpigmentation ²². Previous research works highlighted the presence of carboxylic and dicarboxylic acids in macroalgae. Santos et al. (2016) detected octanedioic and 2-butenedioic acid as majoritarian dicarboxylic acids in *Undaria pinnatifida* and *Cystoseira tamariscifolia* that reached a total amount of 99.8 mg.kg⁻¹ DW and 2.2 mg.kg⁻¹ DW of dicarboxylic acids,

respectively ³. Other report indicated that nonanedioic acid was found in higher concentrations in green seaweeds compared to the other phylum while red macroalgae were mostly composed of octanedioic acid ⁹.

Benzoic acid derivatives comprise a class of aromatic carboxylic acids that are formed during the Shikimate pathway ²³. In the current work, benzoic, benzeneacetic and benzenedicarboxylic acid have been found in green, red and brown Antarctic macroalgae, although other compounds have been detected in seaweeds such as salicylic, gentisic, vanilic and gallic acid ²⁴. Furthermore, benzeneacetic acid can be categorized as an auxin, which is a plant hormone related to root development ²⁵. To the best of our knowledge this was the first time these carboxylic or dicarboxylic acids were detected in the studied Antarctic macroalgae.

4.1.4. Sterols

Sterols comprehend a vast number of compounds that play roles as membrane constituents and hormonal precursors in aquatic and terrestrial organisms ¹⁰. According to the literature, cholesterol and its derivatives are generally predominant in red and green algae while fucosterol and its derivatives are commonly found in brown seaweeds, which was also observed in the current research work ²⁴. Sterols are known for their biological activities that include, for instance, antioxidant, antitumor, antibacterial, antiviral, antifungal and antiulcerative ^{24,26}.

According to the literature, specimens of *A. utricularis* and *Desmarestia anceps* collected in King George Island (Antarctica) also had fucosterol as the main sterol in the macroalgae ¹⁰. Moreover, other steroidal components were also determined in small amounts including, for instance, stigmasterol, cholesterol and ergosterol that were not

observed in the samples of the current work. Differences in extraction and analytical approaches may have influenced the results as specimens were collected under similar environmental conditions. Sterols were also found in noticeable concentrations in other reports in the literature that evaluated *Ulva lactuca* and *Sargassum muticum* collected in the Portuguese coast ^{3,9}.

It is worth noting that previous reports indicated that the content of steroids in macroalgae considerably varies throughout the year reaching maximum values in winter and decreasing summer showing that seasoning play an important role in the steroidal biosynthesis within seaweeds ^{2,27}. As it can be observed in **Table 1**, samples were collected in the Antarctic summer, which could have lowered the concentration of steroids compared to what could be observed in other seasons of the year ²⁷. Moreover, it is thought that other abiotic conditions including water temperature and growth stage may also affect the production of sterols in macroalgae ^{27,28}.

4.1.5. Other Constituents

Several other components that could be distributed into several chemical classes including, for instance, ketones, aldehydes, hydrocarbons and amino acids were detected in the analyzed macroalgae. The presence of these constituents can be related to several biochemical mechanisms within seaweeds to survive in the Antarctic continent as these compounds are linked to defense against oxidant agents and Ultraviolet radiation as well as to chemical signaling among individuals ^{29,30}.

Among the detected substances were α -tocopherol and phytol, which can be found in lipid membranes and storage structures. According to the literature, the content of tocopherols are higher in brown macroalgae than the other classes of seaweeds agreeing

with the results of the current work as α -tocopherol was only observed in Ochrophyta specimens. Moreover, concentrations previously reported of α -tocopherol indicated values ranging from 9.6 to 14 $\mu\text{g.g}^{-1}$ DW in *Undaria pinnatifida*, which was also found in the current chemical evaluation of Antarctic macroalgae²⁷. It is worth noting that the consumption of α -tocopherol and phytol can have biological benefits due to the antioxidant and anticancer activities of these compounds^{9,27}.

Evaluation of the lipophilic profile of Antarctic macroalgae showed the presence of trimethylbenzene, which is thought to derive from sugar or carotenoid degradation³¹. Other types of alkylbenzenes have also been detected in macroalgae including, for instance, ethylbenzene, ethyltoluene and tetramethylbenzene in the analysis of volatile organic compounds of *Oscillatoria perornata* and *Palmaria palmate*^{32,33}. Tetradecane was also observed in small amounts in the specimens and its presence could be associated to chemical signals used in the algal reproductive cycle²⁹.

Concerning other compounds found in the lipophilic profile, dihydroactinidiolide is a carotenoid derivative widely reported in the volatile analysis of macroalgae and it is associated to the prevention of coronary and tumor conditions in humans²⁵. Benzaldehyde was also detected in the specimens and its presence can be associated to pathways of amino acid biosynthesis³⁴. Finally, *L*-cysteine was observed in the samples, which can be related to defense mechanisms of seaweeds against antioxidant stress³⁵. Studying the metabolites of macroalgae, Belghit et al. (2017) also detected noticeable amounts of *L*-cysteine in brown and red seaweeds agreeing with the results of the current work³⁰.

4.2. Antioxidant Activity

Antioxidant evaluation showed that lipophilic extracts from Antarctic macroalgae have distinct degrees in the inhibition of the DPPH radical. Generally, brown algae had more antioxidant activity than red and green representatives, which agree with data reported by the literature ³⁶. In this sense, Paiva et al. (2016) indicated that extracts from *Ulva compressa*, *Gelidium microdon* and *Pterocladia capillacea* at concentrations of 2 mg.mL⁻¹ inhibited the DPPH radical at 40.21 ± 2.84%, 47.73 ± 3.01% and 26.14 ± 1.90% ³⁷. Comparing these results to the obtained in the current research work, it can be observed that *D. confervoides* had more antioxidant capacity than the indicated in the literature while the other specimens had diminished antioxidant activity.

The presence of antioxidants in seaweeds can be associated to mechanisms of defense and survival of these organisms to oxidative stress against abiotic parameters ^{38,39}. Generally, the antioxidant capacity of extracts can be related to certain constituents such as phenolic compounds, carbohydrates, FAs and sterols ^{40,41}. Among the components of lipophilic extracts, octadecenoic and octadecadienoic acids as well as phytosterols have been highlighted as compounds with antioxidant activity ⁴⁰. Indeed, extracts of *D. confervoides*, which had high amounts of these lipid components compared to the other samples portrayed higher inhibition of the DPPH radical than the other macroalgae extracts.

4.3. Antimicrobial Activity

Previous studies on the lipophilic extracts of macroalgae highlighted several biological activities that include, for instance, antimicrobial, anti-inflammatory, antifungal, anticoagulant, antitumor and antioxidant properties ^{11,36,42}. In this sense, metabolites from seaweeds have been receiving increased attention from various areas

including cosmetics, food and pharmaceutical industries due to their widely possible applications².

According to previous research works, antibacterial activity of macroalgae extracts can be associated to the presence of distinct FAs in their constitution^{18,43}. Based on the results, these biomolecules were present in considerable amounts in the samples compared to other biochemical classes. Despite generally having weak bioactivities when isolated, several types of FAs in conjunct can promote bacterial inhibition probably due to synergistic effects⁴³. Among the reasons that can explain the antimicrobial activity of FAs are the amphipathic features of these molecules that can interact and penetrate membranes inducing damages and allowing the diffusion of other molecules that can further affect other biological processes^{11,18}.

The antimicrobial activity found in the extracts from *U. intestinalis*, *C. racovitzae* and *A. utricularis* agree with previous reports that evaluated macroalgae extracts. In this sense, Shanmughapriya et al. (2008) applied methanol:toluene extracts of *Sargassum wightii* and indicated bacterial inhibition to *E. faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *S. aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, for instance⁴⁴. Moreover, Cortés et al. 2014 used dichloromethane extracts from *Ceramium rubrum* to *Yersinia ruckeri* and *Syspastospora parasitica* having MICs of approximately 0.5 mg.mL⁻¹ and 2 mg.mL⁻¹. Therefore, macroalgae extracts were potential antimicrobial agents with promising health applications.

4.4. Multivariate Analysis

Evaluation of the results regarding PCA showed that Antarctic macroalgae could be distinguished by their respective phylum according to parameters that involve

biological activities and chemical composition. In this sense, *D. confervoides* was found in the positive axis of PC1 possibly due to its higher antioxidant capacity while the intermediate concentrations of bioactive compounds and antibacterial activity probably influenced the results of *A. utricularis*. Similarly, antibacterial activity was probably a key parameter for the presence of *C. racovitzae* and *U. intestinalis* in the negative axis of PC1. Finally, intermediate concentrations of FAs, sterols and alcohols as well as little to none biological potential possibly influenced the results of *M. manginii* pushing the sample to the negative axis of PC1.

The results obtained in the multivariate analysis agree with the reported by Kumar et al. (2011) in which the authors evaluated more than 20 macroalgae species from Rodophyta, Chlorophyta and Ochrophyta phyla from the Indian coast ⁴⁵. The study indicated that PCA was influenced by the lower antioxidant activity of red macroalgae compared to brown seaweeds which was observed in the current research work. Moreover, the use of FAs as variables in the multivariate analysis allowed the discrimination of phyla which was also seen in this report ^{45,46}.

Conclusion

The lipophilic profile of *n*-hexane extracts from red, brown and green Antarctic macroalgae was characterized indicating the presence of several compounds mainly as sterols, FAs and other carboxylic acids. Several constituents are generally biosynthesized within seaweeds as defense mechanisms to the extreme conditions of the Antarctic environment. Moreover, PCA indicated that bioactive compounds and their biological activities can be associated to phyla of macroalgae. Therefore, the analyzed species could have could have noticeable potential in biotechnological, pharmaceutical and food areas

since their lipophilic components are associated to biological activities including antibacterial, antifungal and antioxidant potential.

References

1. Shobier AH, Abdel Ghani SA, Barakat KM. GC/MS spectroscopic approach and antifungal potential of bioactive extracts produced by marine macroalgae. *Egypt J Aquat Res.* 2016;42(3):289-299. doi:10.1016/j.ejar.2016.07.003.
2. Andrade PB, Barbosa M, Matos RP, et al. Valuable compounds in macroalgae extracts. *Food Chem.* 2013;138(2-3):1819-1828. doi:10.1016/j.foodchem.2012.11.081.
3. Santos SAO, Oliveira CSD, Trindade SS, Abreu MH, Rocha SSM, Silvestre AJD. Bioprospecting for lipophilic-like components of five Phaeophyta macroalgae from the Portuguese coast. *J Appl Phycol.* 2016;28(5):3151-3158. doi:10.1007/s10811-016-0855-y.
4. Santos MAZ, Colepicolo P, Pupo D, Fujii MT, de Pereira CMP, Mesko MF. Antarctic red macroalgae: a source of polyunsaturated fatty acids. *J Appl Phycol.* 2017;29(2):759-767. doi:10.1007/s10811-016-1034-x.
5. Passos LF, Berneira LM, Poletti T, et al. Evaluation and characterization of algal biomass applied to the development of fingermarks on glass surfaces. *Aust J Forensic Sci.* 2020:1-10. doi:10.1080/00450618.2020.1715478.
6. Martins RM, Santos MAZ dos, Pacheco BS, et al. Fatty acid profile of the chlorophyta species from Chile's sub-Antarctic region. *Acad J Sci Res.* 2016;4:93-98. doi:10.15413/ajsr.2015.0154.

- 524 7. Schmid M, Kraft LGK, van der Loos LM, et al. Southern Australian seaweeds: A
525 promising resource for omega-3 fatty acids. *Food Chem.* 2018;265:70-77.
526 doi:10.1016/j.foodchem.2018.05.060.
- 527 8. Berneira L, da Silva C, Poletti T, et al. Evaluation of the volatile composition and
528 fatty acid profile of seven Antarctic macroalgae. *J Appl Phycol.* 2020.
529 doi:10.1007/s10811-020-02170-9.
- 530 9. Santos SAO, Vilela C, Freire CSR, Abreu MH, Rocha SM, Silvestre AJD.
531 Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting
532 phytochemicals. *Food Chem.* 2015;183:122-128.
533 doi:10.1016/j.foodchem.2015.03.006.
- 534 10. Pereira CMP, Nunes CFP, Zambotti-Villela L, et al. Extraction of sterols in brown
535 macroalgae from Antarctica and their identification by liquid chromatography
536 coupled with tandem mass spectrometry. *J Appl Phycol.* 2017;29(2):751-757.
537 doi:10.1007/s10811-016-0905-5.
- 538 11. Martins RM, Nedel F, Guimarães VBS, et al. Macroalgae extracts from Antarctica
539 have antimicrobial and anticancer potential. *Front Microbiol.* 2018;9:1-10.
540 doi:10.3389/fmicb.2018.00412.
- 541 12. Pellati F, Benvenuti S, Magro L, Melegari M, Soragni F. Analysis of phenolic
542 compounds and radical scavenging activity of Echinacea spp. *Journal of*
543 *Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2004; 35:289-301. doi:10.1016/S0731-
544 7085(03)00645-9.
- 545 13. CLSI, M07-A10: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for
546 Bacteria That Grow Aerobically. In: *CLSI (Clinical and Laboratory Standards*
547 *Institute).* ; 2015.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 548 14. Tanniou A, Vandanjon L, Gonçalves O, Kervarec N, Stiger-Pouvreau V. Rapid
549 geographical differentiation of the European spread brown macroalga *Sargassum*
550 *muticum* using HRMAS NMR and Fourier-Transform Infrared spectroscopy.
551 *Talanta*. 2015;132:451-456. doi:10.1016/j.talanta.2014.09.002.
- 552 15. Li-Beisson Y, Thelen JJ, Fedosejevs E, Harwood JL. The lipid biochemistry of
553 eukaryotic algae. *Prog Lipid Res*. 2019;74:31-68.
554 doi:10.1016/j.plipres.2019.01.003.
- 555 16. Loftsson T, Ilievska B, Asgrimsdottir GM, Ormarsson OT, Stefansson E. Fatty
556 acids from marine lipids: Biological activity, formulation and stability. *J Drug*
557 *Deliv Sci Technol*. 2016;34:71-75. doi:10.1016/j.jddst.2016.03.007.
- 558 17. Kumari P, Kumar M, Reddy CRK, Jha B. Algal lipids, fatty acids and sterols. In:
559 *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*. Woodhead
560 Publishing Limited; 2013:87-134. doi:10.1533/9780857098689.1.87.
- 561 18. Pacheco BS, Dos Santos MAZ, Schultze E, et al. Cytotoxic Activity of Fatty Acids
562 From Antarctic Macroalgae on the Growth of Human Breast Cancer Cells. *Front*
563 *Bioeng Biotechnol*. 2018;6:185. doi:10.3389/fbioe.2018.00185.
- 564 19. Graeve M, Kattner G, Wiencke C, Karsten U. Fatty acid composition of Arctic and
565 Antarctic macroalgae: indicator of phylogenetic and trophic relationships. *Mar*
566 *Ecol Prog Ser*. 2002;231:67-74. doi:10.3354/meps231067.
- 567 20. Becker S, Graeve M, Bischof K. Photosynthesis and lipid composition of the
568 Antarctic endemic rhodophyte *Palmaria decipiens*: effects of changing light and
569 temperature levels. *Polar Biol*. 2010;33:945-955. doi:10.1007/s00300-010-0772-
570 5.

- 571 21. Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can*
572 *J Biochem Physiol.* 1959;37:911-917.
- 573 22. Fitton A, Goa KL. Azelaic Acid. *Drugs.* 1991;41(5):780-798.
574 doi:10.2165/00003495-199141050-00007.
- 575 23. Widhalm JR, Dudareva N. A familiar ring to it: Biosynthesis of plant benzoic
576 acids. *Mol Plant.* 2015;8(1):83-97. doi:10.1016/j.molp.2014.12.001.
- 577 24. Torres P, Santos JP, Chow F, dos Santos DYAC. A comprehensive review of
578 traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus
579 Gracilaria (Gracilariales, Rhodophyta). *Algal Res.* 2019;37:288-306.
580 doi:10.1016/j.algal.2018.12.009.
- 581 25. Torres P, Novaes P, Ferreira LG, et al. Effects of extracts and isolated molecules
582 of two species of Gracilaria (Gracilariales, Rhodophyta) on early growth of lettuce.
583 *Algal Res.* 2018;32:142-149. doi:10.1016/j.algal.2018.03.016.
- 584 26. Santos MAZ dos, Miguel, Roehrs CMP de P, Freitag RA, De and AV, Bairros.
585 Analysis of Phytosterols in Plants and Derived Products by Gas Chromatography
586 – A Short Critical Review. *Austin Publ Gr.* 2014;1(5):1-4.
- 587 27. Boulom S, Robertson J, Hamid N, Ma Q, Lu J. Seasonal changes in lipid, fatty
588 acid, α -tocopherol and phytosterol contents of seaweed, *Undaria pinnatifida*, in the
589 Marlborough Sounds, New Zealand. *Food Chem.* 2014;161:261-269.
590 doi:10.1016/j.foodchem.2014.04.007.
- 591 28. Honya M, Kinoshita T, Ishikawa M, Mori H, Nisizawa K. Seasonal variation in
592 the lipid content of cultured *Laminaria japonica*: fatty acids, sterols, β -carotene and
593 tocopherol. *J Appl Phycol.* 1994;6(1):25-29. doi:10.1007/BF02185900.

- 594 29. de Alencar DB, Diniz JC, Rocha SAS, et al. Chemical composition of volatile
595 compounds in two red seaweeds, *Pterocladia* *capillacea* and *Osmundaria*
596 *obtusiloba*, using static headspace gas chromatography mass spectrometry. *J Appl*
597 *Phycol.* 2017;29(3):1571-1576. doi:10.1007/s10811-016-1020-3.
- 598 30. Bruckner CG, Heesch S, Liland N, et al. In-depth metabolic profiling of marine
599 macroalgae confirms strong biochemical differences between brown, red and green
600 algae. *Algal Res.* 2017;26:240-249. doi:10.1016/j.algal.2017.08.001.
- 601 31. Sun SM, Chung GH, Shin TS. Volatile compounds of the green alga, *Capsosiphon*
602 *fulvescens*. *J Appl Phycol.* 2012;24(5):1003-1013. doi:10.1007/s10811-011-9724-
603 x.
- 604 32. Le Pape M-A, Grua-Priol J, Prost C, Demaimay M. Optimization of Dynamic
605 Headspace Extraction of the Edible Red Algae *Palmaria palmata* and
606 Identification of the Volatile Components. *J Agric Food Chem.* 2004;52(3):550-
607 556. doi:10.1021/jf030478x.
- 608 33. Tellez MR, Schrader KK, Kobaisy M. Volatile components of the cyanobacterium
609 *Oscillatoria perornata* (Skuja). *J Agric Food Chem.* 2001;49(12):5989-5992.
610 doi:10.1021/jf010722p.
- 611 34. Yamamoto M, Baldermann S, Yoshikawa K, Fujita A, Mase N, Watanabe N.
612 Determination of Volatile Compounds in Four Commercial Samples of Japanese
613 Green Algae Using Solid Phase Microextraction Gas Chromatography Mass
614 Spectrometry. *Sci World J.* 2014;2014:1-8. doi:10.1155/2014/289780.
- 615 35. Kakinuma M, Park CS, Amano H. Distribution of free L-cysteine and glutathione
616 in seaweeds. *Fish Sci.* 2001;67(1):194-196. doi:10.1046/j.1444-
617 2906.2001.00223.x.

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
- 618 36. Tenorio-Rodriguez PA, Murillo-Álvarez JI, Campa-Cordova ÁI, Angulo C.
619 Antioxidant screening and phenolic content of ethanol extracts of selected Baja
620 California Peninsula macroalgae. *J Food Sci Technol*. 2017;54(2):422-429.
621 doi:10.1007/s13197-016-2478-3.
- 622 37. Paiva L, Lima E, Isabel A, Marccone M, Baptista J. Health-promoting ingredients
623 from four selected Azorean macroalgae. *Food Res Int*. 2016;89:432-438.
624 doi:10.1016/j.foodres.2016.08.007.
- 625 38. Alves C, Pinteus S, Simões T, et al. Bifurcaria bifurcata: a key macro-alga as a
626 source of bioactive compounds and functional ingredients. *Int J Food Sci Technol*.
627 2016;51(7):1638-1646. doi:10.1111/ijfs.13135.
- 628 39. Zubia M, Fabre MS, Kerjean V, et al. Antioxidant and antitumoural activities of
629 some Phaeophyta from Brittany coasts. *Food Chem*. 2009;116(3):693-701.
630 doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.025.
- 631 40. Fernandes F, Andrade PB, Ferreres F, Gil-Izquierdo A, Sousa-Pinto I, Valentão P.
632 The chemical composition on fingerprint of Glandora diffusa and its biological
633 properties. *Arab J Chem*. 2017;10(5):583-595. doi:10.1016/j.arabjc.2015.01.012.
- 634 41. Feller R, Matos ÂP, Mazzutti S, et al. Polyunsaturated Ω -3 and Ω -6 fatty acids,
635 total carotenoids and antioxidant activity of three marine microalgae extracts
636 obtained by supercritical CO₂ and subcritical n-butane. *J Supercrit Fluids*.
637 2018;133:437-443. doi:10.1016/j.supflu.2017.11.015.
- 638 42. Guedes EAC, dos Santos Araújo MA, Souza AKP, et al. Antifungal Activities of
639 Different Extracts of Marine Macroalgae Against Dermatophytes and Candida
640 Species. *Mycopathologia*. 2012;174(3):223-232. doi:10.1007/s11046-012-9541-z.

- 641 43. Cortés Y, Hormazábal E, Leal H, et al. Electronic Journal of Biotechnology Novel
642 antimicrobial activity of a dichloromethane extract obtained from red seaweed
643 *Ceramium rubrum* (Hudson) (Rhodophyta : Florideophyceae) against *Yersinia*
644 *ruckeri* and *Saprolegnia parasitica* , agents that cause dis. *Elet J Bioch Tech.*
645 2014;17(3):126-131. doi:10.1016/j.ejbt.2014.04.005.
- 646 44. Shanmughapriya S, Manilal A, Sujith S, Selvin J, Kiran GS. Antimicrobial activity
647 of seaweeds extracts against multiresistant pathogens. *Annals of Microbiol*
648 2008;58(3):535-541.
- 649 45. Kumar M, Kumari P, Trivedi N, et al. Minerals, PUFAs and antioxidant properties
650 of some tropical seaweeds from Saurashtra coast of India. *J Appl Phycol.*
651 2011;23(5):797-810. doi:10.1007/s10811-010-9578-7.
- 652 46. de Freitas SC, Berneira LM, dos Santos MAZ. et al. Bioactivity evaluation and
653 composition of extracts from sub-Antarctic macroalgae *Mazzaella laminarioides*
654 at distinct development phases. *Braz. J. Bot.* 2020; 43: 689–696. doi:
655 10.1007/s40415-020-00661-0.

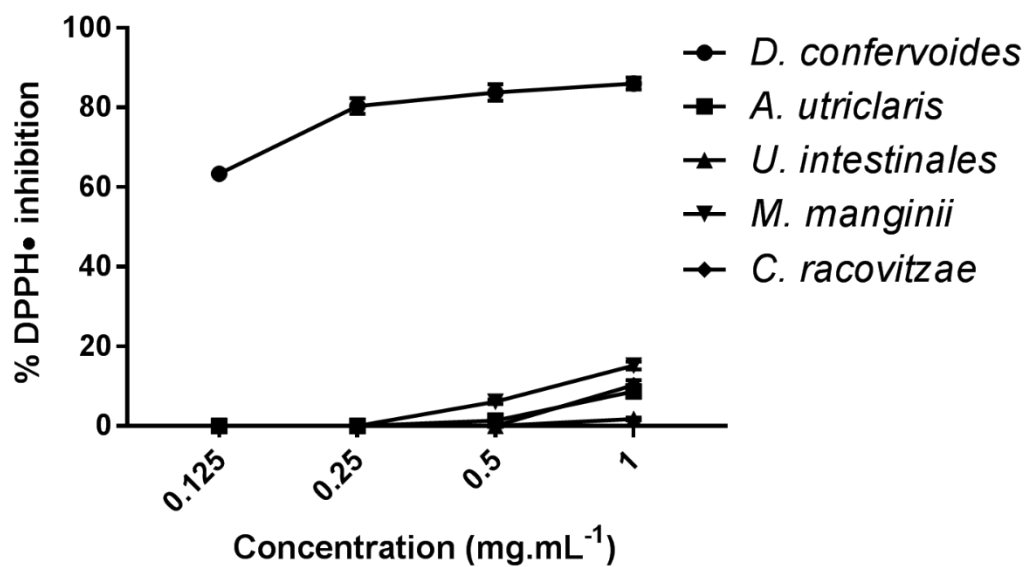


Figure 1. Antioxidant evaluation of lipophilic extracts from Antarctic macroalgae.

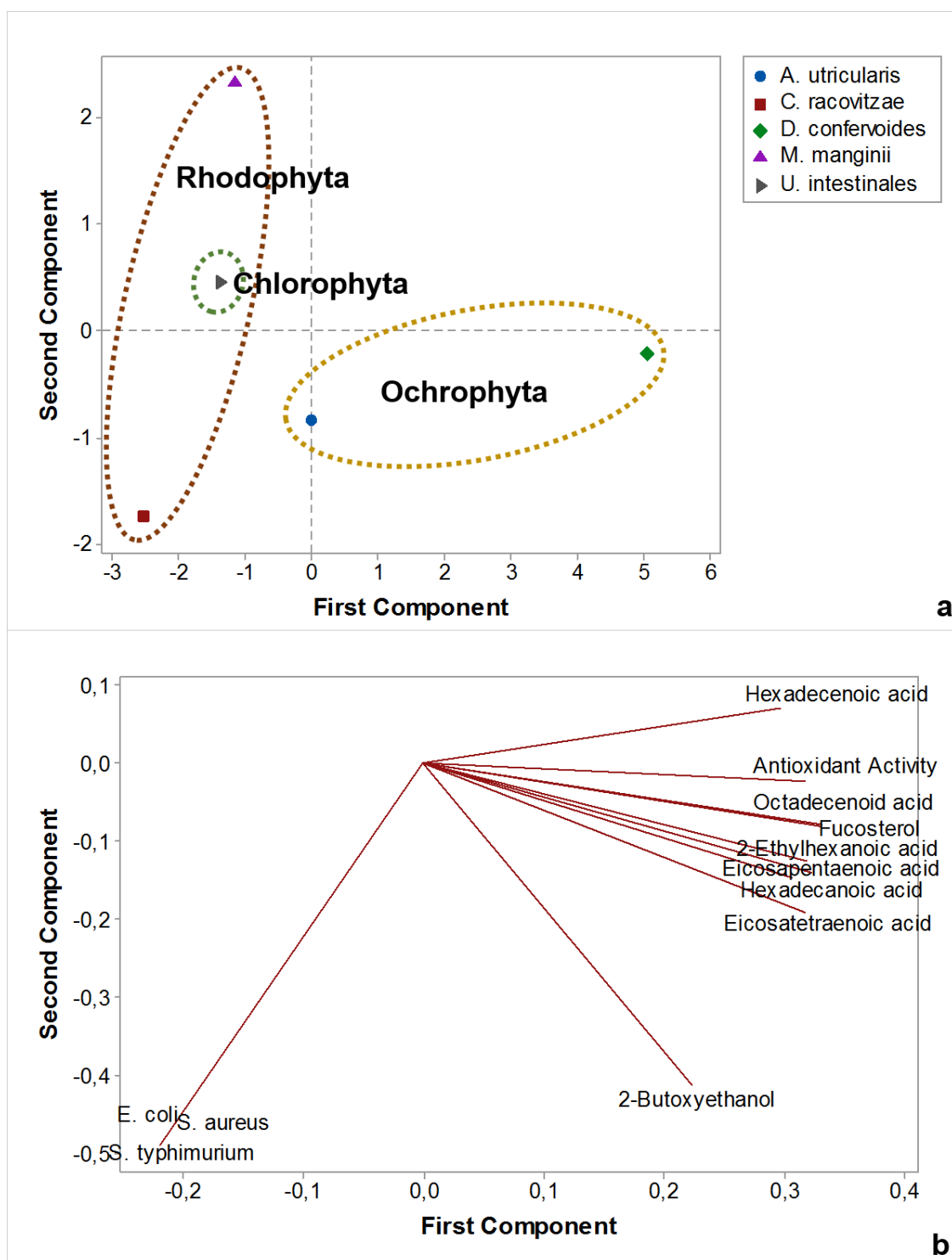


Figure 2. Multivariate analysis of the chemical composition and bioactivity from Antarctic macroalgae.

Table 1. Sampling information of the brown, red and green Antarctic macroalgae.

Species	Collection Site	Coordinates	Collection Date
Ochrophyta			
<i>Adenocystis utricularis</i>	Greenwich Island	62° 29' S × 59° 47' W	December, 2015
<i>Desmarestia confervoides</i>	Hennequim Point	62° 7' S × 58° 23' W	November, 2015
Rhodophyta			
<i>Curdiea racovitzae</i>	Punta Plaza	62° 5' S × 58° 24' W	November, 2015
<i>Myriogramme manginii</i>	Snow Island	62° 46' S × 61° 31' W	December, 2015
Chlorophyta			
<i>Ulva intestinalis</i>	Robert Island	62° 22' S × 59° 41' W	December, 2015

Table 2. Lipophilic extractive yields in dry weight (% DW) for brown, red and green Antarctic macroalgae.

Sample	Extractive Yield (DW %)
<i>U. intestinalis</i>	0.187 ± 0.021 ^{abc}
<i>D. confervoides</i>	0.356 ± 0.038 ^{bc}
<i>A. utricularis</i>	0.189 ± 0.005 ^c
<i>M. manginii</i>	0.134 ± 0.005 ^a
<i>C. racovitzae</i>	0.138 ± 0.003 ^a
Results expressed as mean ± standard deviation of triplicates ($n=3$);	
Different superscript letters indicate significant difference ($p<0.05$).	

Table 3. Chemical constitution of the lipophilic extracts of green, brown and red Antarctic macroalgae expressed as mg.kg⁻¹ of dry material.

Compound	<i>C. racovitzae</i>	<i>D. confervoides</i>	<i>M. manginii</i>	<i>U. intestinalis</i>	<i>A. utricularis</i>
2-Ethylhexanoic acid	11.12 ± 5.48 ^a	49.65 ± 6.32 ^b	11.57 ± 0.48 ^a	22.12 ± 0.07 ^c	30.91 ± 0.30 ^c
5-Oxohexanoic acid	4.69 ± 0.01 ^a	12.42 ± 0.18 ^a	4.50 ± 0.03 ^a	6.29 ± 0.05 ^a	6.47 ± 0.03 ^a
Decanoic acid	nd ^a	nd ^a	nd ^a	10.36 ± 0.03 ^b	nd ^a
Dodecanoic acid	5.27 ± 0.13 ^{ab}	nd ^b	nd ^b	10.89 ± 0.18 ^a	10.42 ± 0.09 ^a
Tetradecanoic acid	5.44 ± 0.14 ^{ac}	28.93 ± 0.38 ^b	nd ^c	8.24 ± 0.15 ^{ac}	14.00 ± 1.00 ^a
Hexadecenoic acid	nd ^a	22.84 ± 0.62 ^b	5.08 ± 0.03 ^a	13.54 ± 0.00 ^c	8.69 ± 0.34 ^c
Hexadecanoic acid	10.10 ± 0.00 ^{ad}	49.01 ± 6.18 ^b	7.92 ± 0.09 ^d	18.92 ± 0.14 ^{ac}	24.73 ± 1.93 ^c
Octadecanoic acid	4.71 ± 0.00 ^a	20.97 ± 0.32 ^b	4.44 ± 0.01 ^a	8.27 ± 0.25 ^a	7.82 ± 0.60 ^a
Octadecenoic acid	5.19 ± 0.00 ^a	75.89 ± 1.55 ^b	5.86 ± 0.12 ^a	13.23 ± 0.19 ^{ac}	18.85 ± 0.38 ^c
<i>trans</i> -Octadecenoic acid	4.92 ± 0.11 ^a	nd ^a	4.55 ± 0.02 ^a	nd ^a	nd ^a
Octadecadienoic acid	4.67 ± 0.13 ^{ac}	26.67 ± 0.01 ^b	nd ^c	nd ^c	10.92 ± 1.60 ^a
Octadecatrienoic acid	nd ^a	nd ^a	nd ^a	6.37 ± 0.02 ^a	nd ^a
Eicosapentaenoic acid	4.96 ± 0.07 ^{ac}	18.49 ± 0.55 ^b	4.79 ± 0.02 ^{ac}	nd ^c	9.69 ± 0.35 ^a

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Eicosatetraenoic acid	4.63± 0.01 ^{ac}	27.00± 11.41 ^b	nd ^{ac}	nd ^{ac}	7.51 ± 0.37 ^a
Fatty acids	66.75 ± 5.01 ^a	331.91 ± 10.79 ^b	48.73 ± 0.77 ^c	118.28 ± 0.16 ^d	150.05 ± 4.29 ^e
Hexanedioic acid	nd ^a	nd ^a	5.20 ± 0.03 ^a	nd ^a	nd ^a
Nonanedioic acid	nd ^a	25.23± 0.38 ^b	nd ^a	nd ^a	nd ^a
Benzoic acid	4.77 ± 0.04 ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a
Benzeneacetic acid	4.69 ± 0.00 ^a	nd ^a	4.47 ± 0.03 ^a	nd ^a	7.07 ± 0.05 ^b
Benzenedicarboxylic acid	nd ^a	13.67 ± 0.25 ^b	4.88 ± 0.03 ^{ab}	nd ^a	nd ^a
Acetyltributylcitrate	4.79 ± 0.06 ^a	nd ^a	4.93 ± 0.08 ^a	nd ^a	nd ^a
Carboxylic acids	14.26 ± 0.10 ^a	38.90 ± 0.64 ^b	19.50 ± 0.17 ^a	nd ^c	7.07 ± 0.05 ^d
Cyclopentanol	5.17 ± 0.02 ^{ac}	13.29 ± 0.08 ^{ab}	nd ^c	6.95 ± 0.00 ^{ac}	nd ^c
2-Butoxyethanol	30.98 ± 0.11 ^a	56.37 ± 26.20 ^b	7.48 ± 0.12 ^c	12.92 ± 0.20 ^c	55.14 ± 9.64 ^b
Methylcyclohexenol	7.81 ± 0.11 ^a	22.20 ± 3.79 ^b	5.59 ± 0.08 ^{ac}	8.28 ± 0.01 ^{ac}	12.55 ± 0.45 ^{ac}
Alcohols	43.97 ± 0.20 ^a	91.87 ± 30.07 ^b	13.07 ± 0.04 ^c	28.16 ± 0.22 ^d	67.70 ± 10.09 ^e
Cholesterol	28.82 ± 0.40 ^a	18.14 ± 0.07 ^a	14.74 ± 0.74 ^b	9.42 ± 0.12 ^b	11.88 ± 0.75 ^b
Hydroxymethylcholesterol	nd ^a	20.15 ± 1.02 ^{bc}	nd ^a	nd ^a	12.83 ± 0.25 ^c

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fucosterol	nd ^a	282.96 ± 29.02 ^b	nd ^a	12.02 ± 0.00 ^c	41.60 ± 3.32 ^d
Sterols	28.82 ± 0.40 ^a	321.25 ± 30.13 ^b	14.74 ± 0.74 ^c	21.45± 0.11 ^d	66.32 ± 4.33 ^e
<i>α</i> -Tocopherol	nd ^a	14.80 ± 0.36 ^b	nd ^a	nd ^a	nd ^a
Phytol	5.66 ± 0.08 ^a	27.40 ± 1.08 ^b	7.23 ± 0.09 ^a	13.14 ± 0.11 ^a	10.05 ± 0.42 ^a
<i>L</i> -cysteine	nd ^a	4.99 ± 0.09 ^b	4.81 ± 0.00 ^b	nd ^a	nd ^a
Tetradecane	5.08 ± 0.00 ^a	4.66 ± 0.09 ^a	4.84 ± 0.03 ^a	7.92 ± 0.14 ^a	6.51 ± 0.00 ^a
Dihydroactinolide	nd ^a	13.45 ± 0.11 ^b	nd ^a	8.09 ± 0.42 ^c	7.89 ± 0.35 ^c
Benzaldehyde	nd ^a	nd ^a	4.68 ± 0.10 ^a	nd ^a	nd ^a
Hydroxymethylpentanone	5.21 ± 0.04 ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a	nd ^a
Trimethylbenzene	5.27 ± 0.06 ^a	5.01 ± 0.07 ^a	4.56 ± 0.02 ^a	4.49 ± 0.00 ^a	6.51 ± 0.37 ^a
Others	21.22 ± 0.18 ^a	70.32 ± 1.61 ^b	26.16 ± 0.01 ^{ac}	33.65 ± 0.69 ^c	30.97 ± 0.43 ^c
Results expressed as mean ± standard deviation of triplicates (<i>n</i> =3).					
Results without a common superscript letter are significant different (<i>p</i> <0.05)					

689
690

Table 4. Antimicrobial evaluation of *n*-hexane extracts from Antarctic macroalgae.

Microorganism	MIC of macroalgae extract (mg.mL ⁻¹)		
	<i>U. intestinalis</i>	<i>C. racovitzae</i>	<i>A. utricularis</i>
<i>Escherichia coli</i>	1.5	3	1.5
<i>Staphylococcus aureus</i>	3	6	3
<i>Salmonella typhimurium</i>	3	> 6	6
<i>Enterococcus faecalis</i>	> 6	1.5	> 6

Note: Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Extracts from *D. confervoides* and *M. manginii* did not have antimicrobial activity in the tested microorganisms.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65



4 Discussão dos Artigos

Vários estudos realizados com macroalgas da Antártica no laboratório (Laboratório Lipidômica e Bio-orgânico, Grupo de Pesquisa Bioforense) vem destacando a variação de compostos químicos encontradas em algas verdes, vermelhas e marrons. Nesse sentido Berneira e colaboradores (2020) analisaram o perfil dos compostos orgânicos voláteis (COV) em macroalgas da Antártica, revelando a presença de aldeídos, hidrocarbonetos, cetonas, álcoois e derivados de furano. Santos e colaboradores (2017) avaliaram o perfil de extratos lipofílicos de quatro macroalgas vermelhas (*Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens*, *Plocamium cartilagineum* e *Pyropia endiviifolia*), identificando e quantificando o ácido linoleico (18: 2n-6), ácido dihomo- γ -linolênico (20: 3n-6) e ácido araquidônico (20: 4n-6). O ácido eicosapentaenoico foi detectado em altas concentrações em todas as espécies, com aproximadamente 62,8% do total AGs em *P. endiviifolia*, 75,4% em *P. decipiens*, 50,4% em *I. cordata* e 20,1% em *P. cartilagineum*.

No estudo realizado por Pereira et al, (2017), diferentes esteroides foram quantificados das algas marrons (*Adenocystis utricularis*, *Ascoseira mirabilis*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia antarctica* e *Himantothallus grandifolius*), sendo o fucosterol o mais abundante (*A. utricularis* 48,13 mg kg⁻¹) seguido pelo β -sitosterol (*A. mirabilis* 16,49 mg kg⁻¹), colesterol, stigmasterol e brassicasterol.

Além disso, as algas tem destaque também na atividade anticâncer e antimicrobiana. Nesse sentido pode-se ressaltar o estudo de Pacheco e colaboradores (2018) demonstrando que os ácidos graxos monoinsaturados (MUFAs) e poli-insaturados (PUFAs) extraídos da macroalga *Adenocystis utricularis*, tem um potencial na redução da proliferação e indução da apoptose em células de câncer de mama. Em outro trabalho recente realizado por Amaral et al., (2020) utilizando AGs extraídos da macroalga *Mazzaella laminarioides*, demonstrou o potencial desses compostos na proliferação em células de câncer de bexiga. Com relação a atividade antimicrobiana, Martins e colaboradores (2018) avaliaram extratos de quatro macroalgas (*Cystosphaera jacquinotii*, *Iridaea cordata*, *Himantothallus grandifolius* e *Pyropia endiviifolia*) demonstrando

que o extrato de acetato de etila da *H. grandifolius* apresentou atividade antifúngica contra todos as cepas de fungos do gênero *Cândida* testadas, incluindo as amostras resistentes ao Fluconazol.

Dando continuidade aos estudos iniciados em nosso grupo de pesquisa, na presente tese inicialmente foi determinada a composição de esteroides em macroalgas vermelhas da Antártica. A amostra que apresentou a maior concentração total de esterol foi *Iridea cordata* (3,98 g Kg⁻¹). *Palmaria decipiens* e *Plocamium cartilagineum* apresentaram valores intermediários (2,47 e 1,42 g Kg⁻¹, respectivamente) e *Pyropia endiviifolia* apresentou o menor nível de concentração de esterol (0,64 g Kg⁻¹) entre as amostras avaliadas.

Em geral, as porcentagens relativas de colesterol quantificadas nessas amostras variaram de 21,0 e 80,2%, brassicasterol (se presente) de 4,6 e 13,7%, campesterol de 3,3 e 11,3%, estigmasterol de 4,8 e 15,9%, β -sitosterol de 7,6 e 26,5%, e fucosterol de 3,9 e 11,6%. Além disso, o brassicasterol não foi quantificado em *I. cordata*, mas foi quantificado nas outras três amostras. Colesterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol e fucosterol estavam presentes em todas as amostras, com diferentes concentrações. O colesterol foi o principal composto em três amostras. Em *P. endiviifolia*, o colesterol apresentou 33,6% de concentração seguido por β -sitosterol (24,0%). Em *I. cordata* e *P. cartilagineum*, o colesterol também foi o composto principal (80,2 e 68,6%, respectivamente) seguido por β -sitosterol (7,6 e 9,3%, respectivamente). No entanto, em *P. decipiens* o composto principal foi β -sitosterol (26,5%) seguido pelo colesterol (21%).

E no segundo manuscrito da presente tese avaliou-se a composição química dos extratos lipofílicos das cinco macroalgas da Antárticas. Mostrou que as macroalgas combinadas apresentam 31 compostos distintos que podem ser AGs, álcoois, esteróis, cetonas, aldeídos, hidrocarbonetos e outras classes químicas. O maior número de compostos foi encontrado em representantes de Ochrophyta, pois *Desmarestia confervoides* e *Adenocystis utricularis* apresentaram 24 e 23 constituintes, respectivamente, enquanto *Ulva intestinalis* teve a menor variedade, chegando a 19 compostos.

A alga *D. confervoides* teve a maioria dos compostos encontrados em concentrações mais elevadas em comparação com as demais amostras

analisadas. Geralmente, ácido 2-etilhexanóico ($11,12 \pm 5,48$ - $49,65 \pm 6,32$ mg.kg⁻¹), ácido hexadecanóico ($7,92 \pm 0,09$ - $49,01 \pm 6,18$ mg.kg⁻¹), 2-butoxietanol ($7,48 \pm 0,12$ - $56,37 \pm 26,20$ mg. Kg⁻¹) e fucosterol (nd - $282,96 \pm 29,02$ mg.kg⁻¹) foram os constituintes encontrados com grandes concentrações nas amostras. A presença desses compostos tornou o extrato lipofílico dominado por AGs ($48,73 \pm 0,77$ - $331,91 \pm 10,79$ mg.kg⁻¹), esteróis ($14,74 \pm 0,74$ - $321,25 \pm 30,13$ mg.kg⁻¹) e álcoois ($13,07 \pm 0,04$ - $51,87 \pm 30,07$ mg.kg⁻¹).

A avaliação da atividade antioxidante dos extratos lipofílicos mostrou que *D. confervoides* inibiu $86,03 \pm 1,47\%$ do radical DPPH na concentração de 1 mg.mL⁻¹ mantendo potencial antioxidante semelhante a 0,500 mg.mL⁻¹ e 0,250 mg.mL⁻¹, que inibiu $83,79 \pm 2,12\%$ e $80,40 \pm 1,94\%$, respectivamente. A menor capacidade antioxidante do extrato lipofílico foi observada em 0,125 mg.mL⁻¹ que apresentou $63,39 \pm 0,49\%$ de inibição do radical DPPH. Além disso, comparando as amostras com o controle positivo (ácido ascórbico) pode-se notar que todos os extratos lipofílicos apresentaram menor atividade antioxidante que o padrão utilizado.

Os extratos lipofílicos de *A. utricularis*, *U. intestinalis*, *M. manginii* e *C. racovitzae* não apresentaram atividade antioxidante em comparação com *D. confervoides*. As amostras inibiram o radical DPPH em grandes proporções a 1 mg.mL⁻¹ atingindo $15,21 \pm 1,01\%$, $10,30 \pm 1,26\%$ e $8,70 \pm 0,91\%$ de inibição para *M. manginii*, *C. racovitzae* e *A. utricularis*, respectivamente. Embora na concentração máxima testada, *U. intestinalis* apresentou pouca capacidade antioxidante inibindo $1,80 \pm 0,36\%$ do radical DPPH. Extratos lipofílicos atuaram principalmente como antioxidantes a 0,500 mg.mL⁻¹, porém seu potencial não pôde ser observado em concentrações inferiores a 0,250 mg.mL⁻¹.

A avaliação antimicrobiana de extratos de n-hexano de macroalgas antárticas indicou que os extratos apresentaram atividade contra a maioria dos microrganismos testados, com exceção de *Enterococcus faecalis*, que apresentou crescimento bacteriano nas concentrações avaliadas (0,187 a 6 mg.mL⁻¹). É importante notar que os extratos de *D. confervoides* e *M. manginii* não apresentaram atividade antimicrobiana nas condições experimentais. Em linhas gerais, os extratos lipofílicos apresentaram concentrações que variaram de 6 a 1,5 mg.mL⁻¹ variando de acordo com a amostra e o microrganismo. Além

disso, as amostras indicaram que as concentrações que inibiram o crescimento bacteriano foram bacteriostáticas para os organismos testados.

De acordo com os resultados a *Escherichia coli* teve seu crescimento inibido acima de $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ para os extratos de *A. utricularis* e *U. intestinalis*, enquanto *C. racovitzae* teve CIM de 3 mg.mL^{-1} . No caso de *Staphylococcus aureus*, a CIM para os extratos de *A. utricularis* e *U. intestinalis* foi de 3 mg.mL^{-1} , enquanto *C. racovitzae* inibiu o crescimento bacteriano em 6 mg.mL^{-1} . Resultados semelhantes foram observados para *Salmonella typhimurium* em que extratos lipofílicos de *C. racovitzae* e *A. utricularis* tiveram CIM de 6 mg.mL^{-1} , enquanto *U. intestinalis* teve atividade antimicrobiana acima de 3 mg.mL^{-1} .

A avaliação dos resultados em relação à análise do componente principal (ACP) mostrou que as macroalgas antárticas podem ser diferenciadas por seus respectivos filos de acordo com parâmetros que envolvem atividades biológicas e composição química. Nesse sentido, *D. confervoides* encontrada no eixo positivo de primeiro componente principal (PC1) possivelmente devido a sua maior capacidade antioxidante enquanto que as concentrações intermediárias de compostos bioativos e atividade antibacteriana provavelmente influenciaram os resultados de *A. utricularis*. Da mesma forma, a atividade antibacteriana foi provavelmente um parâmetro chave para a presença de *C. racovitzae* e *U. intestinalis* encontradas no eixo negativo de PC1. Finalmente, concentrações intermediárias de AGs, esteróis e álcoois, bem como pouco ou nenhum potencial biológico, possivelmente influenciaram os resultados de *M. manginii* empurrando a amostra para o eixo negativo de PC1.

As espécies *P. decipiens*, *I. cordata* e *P. endiviifolia* têm distribuição geográfica relativamente restrita, sendo endêmicas das regiões Antártica e subantártica (RICKER 1987; WIENCKE e CLAYTON 2002). Por outro lado, *P. cartilagineum* é amplamente distribuída por todos os oceanos do mundo, incluindo as águas frias do Ártico e Antártico, águas temperadas da Europa, Ásia, África e Américas, e águas tropicais dos oceanos Pacífico, Atlântico e Índico (YOUNG et al. 2013; LATURNUS et al. 1997).

Por apresentarem uma fonte promissora de fitoesteróis, as algas marinhas têm atraído a atenção de pesquisadores devido aos seus efeitos para a saúde humana. Os esteróis são componentes estruturais das membranas,

desempenhando um papel importante no controle de fluidez e permeabilidade da membrana, transdução de sinal e como hormônios (HERNANDES-LEDESMA & HERRERO 2014).

Dos seis esteroides identificados neste estudo, o colesterol foi o mais abundante em três espécies (*I. cordata*, *P. endiviifolia* e *P. cartilagineum*) e β -sitosterol foi o maior esterol em *P. decipiens*. Lopes e colaboradores (2011) relataram que o principal esterol quantificado por HPLC-DAD em *P. cartilagineum* das águas costeiras portuguesas também foi o colesterol (53,5%) seguido do fucosterol (31%). Sánchez-Machado et al. (2014) também analisou *P. decipiens* (por LC-MS), mas a proporção de colesterol foi 1,3% e β -sitosterol não foi analisada. Além disso, os dois trabalhos relataram que não foi possível separar o campesterol e o estigmasterol por meio de cromatografia líquida. Contudo, no presente estudo, usando GC-MS foi possível quantificar colesterol, brassicasterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol e fucosterol.

É importante mencionar que os esteróis podem ser usados como marcadores quimiotaxonômicos em macroalgas para distinguir membros de Rhodophyceae (algas vermelhas), Chlorophyceae (algas verdes) e Phaeophyceae (algas marrons) (HERNANDES-LEDESMA e HERRERO 2014). O colesterol é o esterol predominante em Rodophyta (AL EASA et al. 1995; KENDEL et al. 2013; KENDEL et al. 2015), enquanto o fucosterol predomina em Phaeophyta e em Chlorophyta, os esteróis principais são isofucosterol em Uvales o clionasterol em Bryopsidales e Siphonocladales (HERNANDES-LEDESMA e HERRERO 2014; KUMARI et al. 2013). Entre as microalgas, a distribuição de esteroides é muito diversa, com detecção de diidroxisterois em Haptophytes, 24-propilidenecolesterol em algas pelagofíticas e 4-desmetil-23,24-dimetil esteroides em diatomáceas. Além disso, crinosteróis, estigmasteróis foram isolados de clororraquinófitos e dinosteróis de dinófitos, exceto para os membros Kareniaceae e *Polarella glacialis* (KUMARI et al. 2013). Os esteróis também podem mostrar padrões distintos em fungos, como o ergosterol sendo o esterol principal biossintetizado (VOLKMAN, 2003).

Em amostras analisadas por cromatografia a gás (Tabela 1), o colesterol foi o principal composto identificado em *Solieria chordalis* (C.Agardh) J. Agardh (80,3%), *Chondria collinsiana* M. Howe (72,9%), *Palisada thuyoides* (Kützinger)

Cassano, Sentíes, Gil-Rodriguez & M.T. Fujii (*Laurencia paniculata*) (100%), *Palisada perforata* (Bory) K.W.Nam (como *Laurencia papillosa*) (68,7%), *Melanothamnus ferulaceus* (Suhr ex J.Agardh) Díaz-Tapia & Maggs (*Polysiphonia ferulacea*) (47,5%) e *Grateloupia turuturu* Yamada (87,7%). Em *Spyridia filamentosa* (Wulfen) Harvey, a proporção de colesterol (23,8%) (AL EASA et al. 1995) era a mesma que os outros compostos (que não foram analisados em nossas amostras). Em *Chondria collinsiana*, β - sitosterol teve a segunda maior concentração, enquanto na *Spyridia filamentosa* foi o principal composto (AL EASA et al. 1995). Na *Palisada perforata*, o estigmasterol teve o segunda maior concentração (31,3%) (AL EASA et al. 1995). *Digenea simplex* (Wulfen) C.Agardh, *Polysiphonia brodiae* (Dillwyn) Sprengel, *Spyridia filamentosa* e *Chondria armata* (Kützinger) Okamura apresentou menores concentrações de colesterol (30,2, 32,0, 23,8, 12,0%, respectivamente) do que as outras amostras (AL EASA et al. 1995; GOVENKAR & WAHIDULLA, 2000).

Tabela 1-Teores relativos de esteróis da literatura em macroalgas vermelhas determinados por CG-MS.

Espécies	Esterol (%)								Referências
	Col	Bras	Erg	Camp	Stig	β -sit	Fuc	O.c.	
<i>Solieria chordalis</i>	80,3	4	-	3,2	-	-	4,4	8,1	Kendel et al. (2015)
<i>Chondria collinsiana</i>	72,9	-	-	-	4,6	12,7	-	9,8	Al Easa et al. (1995)
<i>Digenea simplex</i>	30,2	11,1	-	3,8	9,3	11,9	-	33,7	Al Easa et al. (1995)
<i>Laurencia paniculata</i>	100	-	-	-	-	-	-	-	Al Easa et al. (1995)
<i>Laurencia papillosa</i>	68,7	-	-	-	31,3	-	-	-	Al Easa et al. (1995)
<i>Polysiphonia brodiae</i>	32,0	-	9,3	-	9,3	14,0	-	35,4	Al Easa et al. (1995)
<i>Polysiphonia ferulacea</i>	47,5	8,9	4,0	-	7,0	9,7	-	22,9	Al Easa et al. (1995)
<i>Spyridia filamentosa</i>	23,8	-	8,2	-	13,7	30,5	-	23,8	Al Easa et al. (1995)
<i>Chondria armata</i>	12,0	-	-	-	-	-	-	88,0	Govenkar and Wahidulla (2000)
<i>Grateloupia turuturu</i>	87,7	1,3	-	-	-	-	1,7	9,3	Kendel et al. (2013)

-: não relatado, Col: colesterol, Bras: brassicasterol, Erg: Ergosterol, Camp: campesterol, Stig: estigmasterol, β -Sit: β -Sitosterol e Fuc: fucosterol, O.c. outros compostos.

Algumas correlações entre os locais de coleta e grupos de algas podem ser observados. *Solieria chordalis* e *Grateloupia turuturu* coletados na França apresentou teor de colesterol semelhante, o brassicasterol e o fucosterol também foram identificados. Em relação às algas do Catar, o gênero *Laurencia* apresentou substancial conteúdo relativo de esterol, sendo o colesterol o principal composto. O gênero *Polysiphonia* apresentou menor teor de colesterol em comparação com o gênero *Laurencia*, e outros esteróis, como β -sitosterol e ergosterol também foram identificados. Ergosterol foi detectado em *Spyridia filamentosa*. Embora o ergosterol seja um marcador fúngico, também foi relatado

em algas verdes e vermelhas (VOLKMAN, 2003; AL EASA, et al., 1995). Em relação ao conteúdo de esteroides do gênero *Chondria*, *Chondria collinsiana* coletado no Catar apresentou maior teor de esteroides em comparação com as espécies coletadas em Anjuna (*Chondria armata*). O colesterol foi o principal composto em *Asparagopsis armata* Harvey, *Osmundea pinnatifida* (Hudson) Stackhouse, *Schizymenia dubyi* (Chauvin ex Duby) J.Agardh (52,1, 70,3, 88,4%, respectivamente) (LOPES et al. 2011). No entanto, também foi identificado em concentrações menores na *Piropia dentata* (Kjellman) N.Kikuchi & M.Miyata (como *Porphyra dentata*), *Sphaerococcus coronopifolius* Stackhouse e *Porphyra* sp. (15,0, 34,1 e 8,6%, respectivamente) em comparação com os outros compostos (LOPES et al. 2011; KASBOWSKA et al. 2013). Entre as espécies do gênero *Porphyra*, as recolhidas em Portugal apresentaram menores teores de esteróis. Além disso, β -sitosterol foi o principal esteroide encontrado em *Pyropia dentate* (KASBOWSKA et al. 2013) (Tabela 2).

Tabela 2-Teores relativos de esteróis da literatura em macroalgas vermelhas determinados por HPLC.

Espécies	Esterol (%)					Detector	Referências
	Col	Camp	β -sit	Fuc	O. c.		
<i>Porphyra dentata</i>	15,0	30,0	55,0	-	-	ELSD	Kazłowska et al. (2013)
<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>	34,1	46,6*	-	13,9	5,4	DAD	Lopes et al. (2011)
<i>Asparagopsis armata</i>	52,1		3,7	31,4	12,8	DAD	Lopes et al. (2011)
<i>Osmundea pinnatifida</i>	70,3	6,3*	1,5	16,3	5,6	DAD	Lopes et al. (2011)
<i>Schizymenia dubyi</i>	88,4		7,2	4,4	-	DAD	Lopes et al. (2011)
<i>Porphyra</i> sp.	8,6	2,3*	-	< 1	88,4	MS	Lopes et al. (2011)

-: não detectado, * compostos quantificados juntos, Col: colesterol, Camp: campesterol, β -Sit: β -sitosterol e Fuc: fucosterol, O. c: outros compostos.

Lopes e colaboradores (2011) constataram 300,5 mg Kg⁻¹ de colesterol, 175,4 mg Kg⁻¹ fucosterol e 62,8 mg Kg⁻¹ de campesterol e estigmasterol (quantificados juntos) em *P. cartilagineum*. Os resultados relatados nesta Tese para o mesmo tipo de algas apresentaram maiores concentrações de colesterol (973,76 mg Kg⁻¹), menores de fucosterol (111,99 mg Kg⁻¹) e maiores de

campesterol e estigmasterol (68,39 e 68,35 mg Kg⁻¹, respectivamente) em comparação com os resultados relatados por Lopes e colaboradores (2011).

Embora o colesterol tenha sido o principal composto na maioria das amostras analisadas neste trabalho e em estudos anteriores, a variação na concentração dos compostos podem ser explicadas pela diversidade de amostras, configurações de coleta e tempo de vida, entre outros fatores (LEE, 2008). Dados da literatura também sugerem que a composição de esterol em algas pode mudar devido a diferentes condições ambientais de modo a cumprir suas funções na célula (TEIXEIRA et al. 2019).

AGs estão entre as vastas classes de lipídeos encontradas em macroalgas desempenhando papéis importantes conforme destacados anteriormente, geralmente tendo concentrações mais altas do que outros lipídeos (LI-BEISSON, et al, 2019; KUMARI, et al., 2013). Nesse sentido, a comparação dos resultados obtidos com os relatados da literatura mostrou que os AG majoritários encontrados em *Ulva intestinalis* (ácidos hexadecanóico, hexadecanóico e octadecenóico) também foram determinados por Martins e colaboradores (2016) que analisou as mesmas espécies coletadas na região subantártica. Em relação a *Curidea racovitzae* e *A. utricularis*, os resultados qualitativos foram semelhantes aos da literatura, porém a concentração de PUFA's foi diminuída no presente trabalho em relação ao de Pacheco (2018). Até onde sabemos, *Myriogramme manginii* e *D. confervoides* não tinham seu perfil de AGs previamente determinado na literatura. No entanto, representantes do mesmo filo apresentaram padrões semelhantes aos observados no presente trabalho.

Entre os motivos que podem explicar as variações entre os resultados obtidos e relatados na literatura estão a influência do ambiente antártico que incluem fotoperíodo limitado, baixa temperatura da água, salinidade, disposição de nutrientes e pH 4,20. Esses parâmetros abióticos influenciam a produção de AGs em algas marinhas induzindo principalmente a biossíntese de PUFA's a fim de manter a integridade das membranas (GRAEVE, et al., 2002; BECKER, et al., 2010). Além disso, as diferenças nos métodos de extração também podem ter influenciado os resultados gerais, uma vez que a extração de AGs é geralmente realizada usando solução de clorofórmio: metanol (BLIGH & DYER, 1959).

Além dos esteroides, as macroalgas apresentam outras classes de compostos químicos. A presença de ácidos carboxílicos e dicarboxílicos que incluem, por exemplo, ácido hexanodioico, octanodioico, nonanodioico, undecadioico, tem sido amplamente relatada como constituintes de algas marinhas (SANTOS, et al., 2016; SANTOS, et al., 2017). Esses compostos têm sido associados a atividades biológicas, como atividade antimicrobiana e tratamento da hiperpigmentação cutânea (FITTON & GOA, 1991). Pesquisas anteriores destacaram a presença de ácidos carboxílicos e dicarboxílicos em macroalgas. Santos et al. (2016) detectaram os ácidos octanodioico e 2-butenodioico como ácidos dicarboxílicos majoritários em *Undaria pinnatifida* e *Cystoseira tamariscifolia* que atingiram uma quantidade total de 99,8 mg.kg⁻¹ DW e 2,2 mg.kg⁻¹ DW de ácidos dicarboxílicos, respectivamente. Santos e colaboradores demonstraram que o ácido nonanodioico apresenta concentração mais elevada nas algas verdes em comparação com o outro filo, enquanto as macroalgas vermelhas eram compostas principalmente por ácido octanodioico (SANTOS, et al., 2015).

Os derivados do ácido benzoico compreendem uma classe de ácidos carboxílicos aromáticos que são formados na via do ácido chiquímico (WIDHALM & DUDAREVA, 2015). No presente estudo, os ácidos benzóico, benzenoacético e benzenodicarboxílico foram encontrados em macroalgas Antárticas verdes, vermelhas e marrons, embora outros compostos tenham sido detectados em algas marinhas tais como ácido salicílico, gentísico, vanílico e gálico (TORRES, et al., 2019). Além disso, o ácido benzenoacético pode ser categorizado como uma auxina, que é um hormônio vegetal relacionado ao desenvolvimento da raiz (TORRES, et al., 2018). Até onde sabemos, esta foi a primeira vez que esses ácidos carboxílicos ou dicarboxílicos foram detectados nas macroalgas Antárticas estudadas.

Outra classe de compostos analisadas nesses extratos foram os esteroides. Os esteróis compreendem um vasto número de compostos que desempenham funções como constituintes da membrana e precursores hormonais em organismos aquáticos e terrestres (PEREIRA, et al., 2017). De acordo com a literatura, o colesterol e seus derivados são geralmente predominantes em algas vermelhas e verdes, enquanto o fucosterol e seus

derivados são comumente encontrados em algas marrom, esse resultado também foi encontrado no presente trabalho (TORRES, et al., 2019). Os esteróis são conhecidos por suas atividades biológicas que incluem, por exemplo, antioxidante, antitumoral, antibacteriana, antiviral, antifúngica e antiulcerativa (TORRES, et al., 2019; SANTOS, et al 2014).

De acordo com a literatura, espécies de *A. utricularis* e *Desmarestia anceps* coletados na Ilha King George (Antártica) também apresentavam fucosterol como principal esteroide (PEREIRA, et al., 2017). Além disso, outros esteroides também foram determinados em pequenas quantidades, incluindo, por exemplo, o estigmasterol, colesterol e ergosterol que não foram observados nas amostras desse trabalho. As diferenças na extração e nas abordagens analíticas podem ter influenciado os resultados, visto que as espécies foram coletadas em condições ambientais semelhantes. Esteroides também foram encontrados em outros estudos que avaliaram *Ulva lactuca* e *Sargassum muticum* coletada na costa portuguesa (SANTOS, et al., 2016; SANTOS, et al., 2015).

É importante notar que trabalhos anteriores indicaram que o conteúdo de esteroides nas macroalgas varia consideravelmente ao longo do ano, atingindo valores máximos no inverno e diminuindo no verão, mostrando que a temperatura desempenha um papel importante na biossíntese de esteroides em algas marinhas (ANDRADE, et al., 2013; BOULOM, et al., 2014). As amostras do referente estudo foram coletadas no verão antártico, o que pode ter diminuído a concentração de esteroides em relação ao que poderia ser observado em outras estações do ano (BOULOM, et al., 2014). Além disso, acredita-se que outras condições abióticas incluindo a água, temperatura e estágio de crescimento também podem afetar a produção de esteróis em macroalgas (BOULOM, et al., 2014; HONYA, et al., 1994).

Vários outros componentes que podem estar distribuídos em várias classes químicas incluindo, por exemplo, cetonas, aldeídos e hidrocarbonetos foram detectados nas macroalgas analisadas. A presença desses constituintes pode estar relacionada a diversos mecanismos bioquímicos dentro das algas para sobreviver no continente Antártico, pois esses compostos estão ligados à defesa contra agentes oxidantes e à luz ultravioleta (DE ALENCAR, et al., 2017; BRUCKNER, et al., 2017).

Entre as substâncias detectadas estavam o α -tocoferol e o fitol, que podem ser encontrados em membranas lipídicas e estruturas de armazenamento. De acordo com a literatura, o teor de tocoferóis é maior nas macroalgas marrons do que nas demais classes de algas marinhas concordando com os resultados do presente trabalho, visto que o α -tocoferol foi observado apenas em espécimes de Ochrophyta. Além disso, as concentrações previamente relatadas de α -tocoferol indicaram valores variando de 9,6 a 14 $\mu\text{g.g}^{-1}$ em *Undaria pinnatifida*, o que também foi encontrado na atual avaliação química de macroalgas Antárticas (BOULOM, et al., 2014). É importante notar que o consumo de α -tocoferol e fitol podem apresentar benefícios biológicos devido às atividades antioxidante e anticâncer desses compostos (SANTOS, et al., 2015; BOULOM, et al., 2014).

A avaliação do perfil lipofílico de macroalgas Antárticas também mostrou a presença de trimetilbenzeno, que se acredita derivar da degradação de açúcar ou carotenoide (SUN, et al., 2012). Outros tipos de alquilbenzenos também foram detectados em macroalgas, incluindo, por exemplo, etilbenzeno, etiltolueno e tetrametilbenzeno na análise de compostos orgânicos voláteis de *Oscillatoria perornata* e *Palmaria palmate* (LE PAPE, et al., 2004; TELLEZ, et al 2001). O tetradecano também foi observado em pequenas quantidades nos espécimes e sua presença pode estar associada a sinais químicos utilizados no ciclo reprodutivo das algas (DE ALENCAR, et al., 2017).

Em relação a outros compostos encontrados no perfil lipofílico, a diidroactinidiolida é um derivado carotenóide amplamente relatado na análise de compostos voláteis de macroalgas e está associado à prevenção de doenças coronarianas e tumores em humanos (TORRES, et al., 2018). O benzaldeído também foi detectado nas amostras e sua presença pode ser associada a vias de biossíntese de aminoácidos (YAMAMOTO, et al., 2014). Por fim, L-cisteína foi observada nas amostras, o que pode estar relacionado aos mecanismos de defesa das algas marinhas (KAKINUMA, et al., 2001). Estudando os metabólitos de macroalgas, Belghit et al. (2017) também detectaram quantidades maiores de L-cisteína em algas marrons e vermelhas, concordando com os resultados do presente estudo (BRUCKNER, et al., 2017).

A avaliação antioxidante mostrou que extratos lipofílicos de macroalgas Antárticas apresentam graus distintos de inibição do radical DPPH. Geralmente,

as algas marrons apresentam mais atividade antioxidante do que os representantes vermelhos e verdes, o que concorda com os dados relatados pela literatura (TENORIO-RODRIGUEZ, et al., 2017). Nesse sentido, Paiva et al. (2016) demonstraram que extratos de *Ulva compressa*, *Gelidium microdon* e *Pterocladia capillacea* nas concentrações de 2 mg.mL⁻¹ inibiram o radical DPPH em 40,21 ± 2,84%, 47,73 ± 3,01% e 26,14 ± 1,90%. Comparando esses resultados com os obtidos no presente trabalho, pode-se observar que *D. confervoides* apresentou maior capacidade antioxidante do que a indicada na literatura.

A presença de antioxidantes em algas marinhas pode estar associada a mecanismos de defesa e sobrevivência desses organismos ao estresse oxidativo contra parâmetros abióticos (ALVES, et al., 2016; ZUBIA, et al., 2009). A capacidade antioxidante dos extratos pode estar relacionada a certos constituintes, como compostos fenólicos, AGs e esteróis (FERNANDES, et al., 2017; FELLER, et al., 2018). Dentre os componentes dos extratos lipofílicos, os ácidos octadecenóico e octadecadienóico, bem como os fitoesteróis, têm se destacado como compostos com atividade antioxidante (FERNANDES, et al., 2017). De fato, os extratos de *D. confervoides*, que continham quantidades elevadas desses componentes lipídicos em comparação com as demais amostras, apresentaram maior inibição do radical DPPH do que os outros extratos de macroalgas.

Estudos anteriores sobre os extratos lipofílicos de macroalgas destacaram várias atividades biológicas que incluem, por exemplo, propriedades antimicrobiana, anti-inflamatória, antifúngica, anticoagulante, antitumoral e antioxidante (MARTINS, et al., 2018; TENORIO-RODRIGUEZ, et al., 2017; GUEDES, et al., 2012). Nesse sentido, metabólitos de algas marinhas vêm recebendo cada vez mais atenção de diversas áreas, incluindo as indústrias cosmética, alimentícia e farmacêutica, devido às suas possibilidades de aplicação (ANDRADE, et al., 2013).

De acordo com pesquisas anteriores, a atividade antibacteriana de extratos de macroalgas pode estar associada à presença de AGs distintos em sua constituição (PACHECO, et al., 2018; CORTES, et al., 2014). Com base nos resultados, essas biomoléculas estavam presentes em quantidades

consideráveis nas amostras em comparação com outras classes bioquímicas. Apesar de geralmente apresentarem bioatividades fracas quando isolados, vários tipos de AGs em conjunto podem promover a inibição bacteriana provavelmente devido aos efeitos sinérgicos (CORTES, et al., 2014). Entre os motivos que podem explicar a atividade antimicrobiana dos AGs estão as características anfipáticas dessas moléculas que podem interagir e penetrar nas membranas induzindo danos e permitindo a difusão de outras moléculas (MARTINS, et al., 2018; PACHECO, et al., 2018).

A atividade antimicrobiana encontrada nos extratos de *U. intestinalis*, *C. racovitzae* e *A. utricularis* está de acordo com trabalhos anteriores que avaliaram extratos de macroalgas. Nesse sentido, Shanmughapriya et al. em 2008 utilizando extratos de metanol: tolueno de *Sargassumwightii* demonstraram inibição bacteriana a *E. faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, por exemplo. Além disso, Cortés et al. (2014) utilizaram extratos de diclorometano de *Ceramium rubrum* para *Yersinia ruckeri* e *Syspastospora parasitica* e determinaram MIC de aproximadamente 0,5 mg.mL⁻¹ e 2 mg.mL⁻¹. Portanto, extratos de macroalgas são potenciais agentes antimicrobianos com aplicações promissoras na saúde.

Os resultados obtidos na análise multivariada concordam com o relatado por Kumar et al. (2011) em que os autores avaliaram mais de 20 espécies de macroalgas de Rodophyta, Chlorophyta e Ochrophyta da costa indiana. O estudo indicou que o ACP foi influenciado pela menor atividade antioxidante das macroalgas vermelhas em comparação com as algas marrons que foi observada no trabalho de pesquisa atual. Além disso, o uso de AGs como variáveis na análise multivariada permitiu a discriminação de filos, o que também foi visto neste trabalho.

Em resumo, este estudo descreve a identificação e quantificação de seis esteróis (colesterol, brassicasterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol e fucosterol) em quatro espécies de macroalgas vermelhas da Antártica (*P. decipiens*, *P. cartilagineum*, *I. cordata* e *P. endiviifolia*) por CG-EM, que contribui para o conhecimento da quimiodiversidade das espécies sob estudo e suas possíveis aplicações bioativas como nutracêuticos e farmacêuticos. E o perfil lipofílico e a atividade antibacteriana e antioxidante dos extratos n-hexânico das

macroalgas vermelhas, marrons e verdes da Antártica, destacam a presença de diversos compostos principalmente esteróis, AGs e outros ácidos carboxílicos. Além disso, na análise do componente principal mostrou que compostos bioativos e suas atividades biológicas podem estar associados a filos de macroalgas.

Os resultados relatados aqui podem ser aplicados em estudos futuros para investigar perfis de esteroides em macroalgas Antárticas e outros microrganismos encontrados em regiões polares, como microalgas e fungos. Além disso, as espécies analisadas podem ter um potencial nas áreas biotecnológica, farmacêutica e alimentícia, uma vez que seus componentes lipofílicos estão associados a atividades biológicas incluindo potencial antibacteriano e antioxidante.

5 Conclusões e perspectivas

Em suma concluiu-se a identificação e quantificação de seis esteróis (colesterol, brassicasterol, campesterol, estigmasterol, β -sitosterol e fucosterol) em macroalgas vermelhas coletadas na Antártica. O colesterol com maior concentração em *Iridea cordata* ($3195,69 \text{ mg kg}^{-1}$) e o β -sitosterol em *Palmaria decipiens* ($654,18 \text{ mg kg}^{-1}$). Utilizamos a técnica de identificação CG / EM, amplamente utilizada para esteroides. Este estudo contribui para o conhecimento da quimiodiversidade das espécies em estudo e suas possíveis aplicações em nutracêuticos e farmacêuticos.

O perfil lipofílico de extrato hexânico das macroalgas vermelha, marrom e verde foi caracterizado indicando a presença de vários compostos principalmente esteróis, AGs e ácidos carboxílicos. *Desmarestia confervoides* foi a macroalga com a maior concentração de ácidos graxos ($331,91 \text{ mg/kg}^{-1}$), ácidos carboxílicos ($38,90 \text{ mg/kg}^{-1}$), alcoóis ($91,87 \text{ mg/kg}^{-1}$) e esteroides ($321,25 \text{ mg/kg}^{-1}$). Além disso, *D. confervoides* apresentou a maior inibição do radical DPPH (86,03%) na concentração de 1 mg/mL^{-1} . Na atividade antimicrobiana as macroalgas *Ulva intestinalis*, *Curidea racovitzae* e *Adenocystis utricularis* apresentaram inibição frente as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* nas concentrações de $1,5$ à 6 mg/mL^{-1} . Além disso, a análise do componente principal indicou que os compostos bioativos e suas atividades podem ser associadas a filos de macroalgas. Portanto, as espécies analisadas poderiam ser utilizadas em diversas áreas de estudo, uma vez que seus componentes lipofílicos estão associados a atividades biológicas, incluindo potencial antibacteriano e antioxidante.

As perspectivas para continuar pesquisas relacionadas com macroalgas da Antártica, podem contemplar sua aplicação em diversas indústrias como a de alimentos e a farmacêutica. Inicialmente tem a necessidade de obter extratos com solventes de diferentes polaridades. Posteriormente, estudos relacionados a citotoxicidade, eficiência frente à isolados hospitalares resistentes aos antimicrobianos de escolha e diferentes métodos de atividade antioxidantes devem ser realizados. E para introduzir esse produto natural, pesquisas avançadas como estudos clínicos devem ser realizados, assim como, a

identificação dos compostos químicos presentes nesses extratos resultando a compreensão entre os extratos e as atividades biológicas.

6 Referências Bibliográficas

ABDALLAH, E. M. Plants: An alternative source for antimicrobials (2011) **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, Saudi Arabia, v.01, n. 06, p. 16-20.

AL EASA HS, KORNPORST JM, RIZK AM (1995) **Major sterol composition of some algae from Qatar**. *Phytochemistry* 39:373-374.

ALVES, C., PINTEUS, S., SIMÕES, T., HORTA, A., SILVA, J., TECELÃO, C., & PEDROSA, R. (2016). ***Bifurcaria bifurcata*: a key macro-alga as a source of bioactive compounds and functional ingredients**. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(7), 1638-1646.

ANDRADE, P. B., BARBOSA, M., MATOS, R. P., LOPES, G., VINHOLES, J., MOUGA, T., & VALENTÃO, P. (2013). **Valuable compounds in macroalgae extracts**. *Food chemistry*, 138(2-3), 1819-1828.

ANDRADE, P. B., BARBOSA, M., MATOS, R. P., LOPES, G., VINHOLES, J., MOUGA, T., & VALENTÃO, P. (2013). **Valuable compounds in macroalgae extracts**. *Food chemistry*, 138(2-3), 1819-1828.

ARUOMA, O.I. (2003) **Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods**. *Mutation Research*, v.9-20, p.523-524.

BALBOA, E. M., CONDE, E., MOURE, A., FALQUÉ, E., & DOMÍNGUEZ, H. (2013). **In vitro antioxidant properties of crude extracts and compounds from brown algae**. *Food chemistry*, 138(2-3), 1764-1785.

BECKER, S., GRAEVE, M., & BISCHOF, K. (2010). **Photosynthesis and lipid composition of the Antarctic endemic rhodophyte *Palmaria decipiens*: effects of changing light and temperature levels**. *Polar Biology*, 33(7), 945-955.

BELGHIT, I., RASINGER, J. D., HEESCH, S., BIANCAROSA, I., LILAND, N., TORSTENSEN, B., ... & BRUCKNER, C. G. (2017). **In-depth metabolic profiling of marine macroalgae confirms strong biochemical differences between brown, red and green algae**. *Algal research*, 26, 240-249.

BERNEIRA, L., DA SILVA, C., POLETTI, T., RITTER, M., DOS SANTOS, M., COLEPICCOLO, P., & DE PEREIRA, C. M. P. (2020). **Evaluation of the volatile composition and fatty acid profile of seven Antarctic macroalgae**. *Journal of Applied Phycology*, 1-11.

BLIGH, E. G., & DYER, W. J. (1959). **A rapid method of total lipid extraction and purification**. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911-917.

BOULOM, S., ROBERTSON, J., HAMID, N., MA, Q., & LU, J. (2014). **Seasonal changes in lipid, fatty acid, α -tocopherol and phytosterol contents of**

seaweed, *Undaria pinnatifida*, in the Marlborough Sounds, New Zealand. Food chemistry, 161, 261-269.

BOUZIDI, N., DAGHBOUCHE, Y., HATTAB, M.E., ALICHE, Z., CULIOLI, G., PIOVETTI, L., GARRIGUES, S., DE LA GUARDIA, M. (2008). **Determination of total sterols in brown algae by Fourier transform infrared spectroscopy.** Anal Chim Acta 616:185–189.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. (1995). **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity.** Food Science and Technology, v.28, p.25-30.

BUTT, U., ELSHAER, A., SNYDER, L. A., AL-KINANI, A. A., LE GRESLEY, A., & ALANY, R. G. (2018) **Fatty Acid Based Microemulsions to Combat Ophthalmia Neonatorum Caused by *Neisseria gonorrhoeae* and *Staphylococcus aureus*.** Nanomaterials, v. 8, n. 1, p. 51.

CALDAS-ARIAS, L. **Bacterias-Biofilms y resistencia antimicrobiana.** (2015) Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud Universidad del Cauca, v. 17, n. 1, p. 20-27.

CHAPMAN, R. L. (2013). **Algae: the world's most important “plants” —an introduction.** Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change, 18(1), 5-12.

CHINCHOLE, R.; HATRE, P. M.; DESAI, U.; CHAVAN, R. (2012). **Recent applications of hyphenated liquid chromatography techniques in forensic toxicology: a review.** International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, Bangalore, v. 14, n. 1.

COLLINS, C. H. (2006) **Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma.** Química Nova, São Paulo, v. 29, n. 4.

CORTÉS, Y., HORMAZÁBAL, E., LEAL, H., URZÚA, A., MUTIS, A., PARRA, L., & QUIROZ, A. (2014). **Novel antimicrobial activity of a dichloromethane extract obtained from red seaweed *Ceramium rubrum* (Hudson) (Rhodophyta: Florideophyceae) against *Yersinia ruckeri* and *Saprolegnia parasitica*, agents that cause diseases in salmonids.** Electronic Journal of Biotechnology, 17(3), 126-131.

CRF-SP: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo (2011). **Antibióticos: Projeto Farmácia Estabelecimento de Saúde.** 1ªed. São Paulo: Tiragem, 90p.

DAPPER, T. B., PUJARRA, S., DE OLIVEIRA, A. J., DE OLIVEIRA, F. G., & PAULERT, R.(2013) **Potencialidades das macroalgas marinhas na agricultura: revisão/review of the potentialities of sea macroalgae in agriculture.** Revista em Agronegócio e Meio Ambiente, v. 7, n. 2.

DAVOODBASHA, M., EDACHERY, B., NOORUDDIN, T., LEE, S. Y., & KIM, J. W. (2018). **An evidence of C16 fatty acid methyl esters extracted from microalga for effective antimicrobial and antioxidant property.** *Microbial pathogenesis*, 115, 233-238.

DE ALENCAR, D. B., DINIZ, J. C., ROCHA, S. A. S., DOS SANTOS PIRES-CAVALCANTE, K. M., FREITAS, J. O., NAGANO, C. S., ... & SAKER-SAMPAIO, S. (2017). **Chemical composition of volatile compounds in two red seaweeds, *Pterocladia capillacea* and *Osmundaria obtusiloba*, using static headspace gas chromatography mass spectrometry.** *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1571-1576.

DE ALENCAR, D. B., DOS SANTOS PIRES-CAVALCANTE, K. M., DE SOUSA, M. B., VIANA, F. A., & SAKER-SAMPAIO, S. (2011). **Aminas biogênicas em macroalgas marinhas do Estado do Ceará, Brasil.** *Revista Ciência Agronômica*, v. 42, n. 2.

DE ALMEIDA, C. L. F., FALCÃO, D. S., LIMA, D. M., GEDSON, R., MONTENEGRO, D. A., LIRA, N. S., ... & BARBOSA-FILHO, J. M. (2011). **Bioactivities from marine algae of the genus *Gracilaria*.** *International journal of molecular sciences*, 12(7), 4550-4573.

DE CARVALHO, L. R., & ROQUE, N. F. (2000). **Fenóis halogenados e/ou sulfatados de macroalgas marinhas.** *Química Nova*, 23(6), 757.

DESBOIS, A. P., & SMITH, V. J. (2010). **Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential.** *Applied microbiology and biotechnology*, v. 85, n. 6, p. 1629-1642.

DO-AMARAL, C. C. F., PACHECO, B. S., SEGATTO, N. V., PASCHOAL, J. D. F., SANTOS, M. A. Z., SEIXAS, F. K., ... & COLLARES, T. (2020). **Lipidic profile of sub-Antarctic seaweed *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales, Rhodophyta) in distinct developmental phases and cell cytotoxicity in bladder cancer.** *Algal Research*, 48, 101936.

DOS SANTOS, M. A. Z., ROEHRS, M., DE PEREIRA, C. M. P., FREITAG, R. A., & DE BAIRROS, A. V. (2014). **Analysis of phytosterols in plants and derived products by gas chromatography—a short critical review.** *Austin Chromatogr*, 1(5), 4.

DUAN, X. J., ZHANG, W. W., LI, X. M., & WANG, B. G. (2006). **Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from a red alga, *Polysiphonia urceolata*.** *Food chemistry*, 95(1), 37-43.

FELLER, R., MATOS, Â. P., MAZZUTTI, S., MOECKE, E. H., TRES, M. V., DERNER, R. B., ... & JUNIOR, A. F. (2018). **Polyunsaturated ω -3 and ω -6 fatty acids, total carotenoids and antioxidant activity of three marine microalgae extracts obtained by supercritical CO₂ and subcritical n-butane.** *The Journal*

of Supercritical Fluids, 133, 437-443.

FERNANDES, F., ANDRADE, P. B., FERRERES, F., GIL-IZQUIERDO, A., SOUSA-PINTO, I., & VALENTAO, P. (2017). **The chemical composition on fingerprint of *Glandora diffusa* and its biological properties**. Arabian Journal of Chemistry, 10(5), 583-595.

FITTON, A., & GOA, K. L. (1991). **Azelaic acid**. Drugs, 41(5), 780-798.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. (2000) **The problem of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants**. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.80, p.1925-1941.

GOVENKAR MB, WAHIDULLA S (2000) **Free Sterols of the Red Alga *Chondria armata* (Kütz.) Okamura**. Bot Mar 43:201-204.

GRAEVE, M., KATTNER, G., WIENCKE, C., & KARSTEN, U. (2002). **Fatty acid composition of Arctic and Antarctic macroalgae: indicator of phylogenetic and trophic relationships**. Marine Ecology Progress Series, 231, 67-74.

HERNANDEZ-LEDESMA B, HERRERO M (2014) **Sterols in Algae and Health**. In: Lopes G, Sousa C, Valentão P, Andrade, P (eds) **Bioactive Compounds from Marine Foods**, 1 st edn. Wiley Blackwell, Chinchester, pp.173-187.

HONYA, M., KINOSHITA, T., ISHIKAWA, M., MORI, H., & NISIZAWA, K. (1994). **Seasonal variation in the lipid content of cultured *Laminaria japonica*: fatty acids, sterols, β -carotene and tocopherol**. Journal of Applied Phycology, 6(1), 25-29.

IKEDA, K., KITAMURA, A., MACHIDA, H., WATANABE, M., NEGISHI, H., HIRAOKA, J., & NAKANO, T. (2003). **Effect of *Undaria pinnatifida* (Wakame) on the development of cerebrovascular diseases in stroke-prone spontaneously hypertensive rats**. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 30(1-2), 44-48.

KABARA, J. J. (1984) Antimicrobial agents derived from fatty acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 61, n. 2, p. 397-403.

KAKINUMA, M., PARK, C. S., & AMANO, H. (2001). **Distribution of free L-cysteine and glutathione in seaweeds**. Fisheries science, 67(1), 194-196.

KAZLOWSKA K, LIN HV, CHANG S, TSAI G (2013) **In vitro and in vivo anticancer effects of sterol fraction from red algae *Porphyra dentate***. J Evidence-Based Complementary Altern Med 2013:1-10.

KENDEL M, COUZINET-MOSSION A, VIAU M, FLEURENCE J, BARNATHAN G, WIELGOSZ-COLLIN G (2013) **Seasonal composition of lipids, fatty acids,**

and sterols in the edible red alga *Grateloupia turuturu*. J Appl Phycol 25:425-432.

KENDEL, M., WIELGOSZ-COLLIN, G., BERTRAND, S., ROUSSAKIS, C., BOURGOUGNON, N., & BEDOUX, G. (2015). **Lipid composition, fatty acids and sterols in the seaweeds *Ulva armoricana* and *Solieria chordalis* from Brittany (France): An analysis from nutritional, chemotaxonomic, and antiproliferative activity perspectives.** Marine drugs, 13(9), 5606-5628.

KHORAMNIA, A., EBRAHIMPOUR, A., GHANBARI, R., AJDARI, Z., & LAI, O. M.(2013) **Improvement of medium chain fatty acid content and antimicrobial activity of coconut oil via solid-state fermentation using a Malaysian *Geotrichum candidum*.** BioMed research international.v. 2013.

KUMAR, M., KUMARI, P., TRIVEDI, N., SHUKLA, M. K., GUPTA, V., REDDY, C. R. K., & JHA, B. (2011). **Minerals, PUFAs and antioxidant properties of some tropical seaweeds from Saurashtra coast of India.** Journal of Applied Phycology, 23(5), 797-810.

KUMARI, P., KUMAR, M., REDDY, C. R. K., & JHA, B. (2013). **Algal lipids, fatty acids and sterols.** In Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals (pp. 87-134).

LATURNUS F, ADAMS FC, GOMÉZ I, MEHRTENS G (1997) **Halogenating activities detected in Antarctic macroalgae** Polar Biol 17:281-284.

LE PAPE, M. A., GRUA-PRIOL, J., PROST, C., & DEMAIMAY, M. (2004). **Optimization of dynamic headspace extraction of the edible red algae *Palmaria palmata* and identification of the volatile components.** Journal of agricultural and food chemistry, 52(3), 550-556.

LEE RE (2008) **Phycology.** Cambridge University Press, Colorado, pp 1-27.

LEE, S., LEE, Y. S., JUNG, S. H., KANG, S. S., & SHIN, K. H. (2003). **Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*.** Archives of Pharmacal Research, 26(9), 719-722.

LI-BEISSON, Y., THELEN, J. J., FEDOSEJEVS, E., & HARWOOD, J. L. (2019). **The lipid biochemistry of eukaryotic algae.** Progress in lipid research, 74, 31-68.

LIMA, L. A., ALVES, T. M., ZANI, C. L., PIMENTA, L. P., & BOAVENTURA, M. A. D. (2012) **Antioxidant and cytotoxic potential of fatty acid methyl esters from the seeds of *Annona cornifolia* A. St.-Hil.(Annonaceae).** Food research international, v. 48, n. 2, p. 873-875.

LOPES G, SOUSA C, BERNARDO J, ANDRADE PB, VALENTÃO P, FERRERES F, MOUGA T (2011) **Sterol profiles in 18 macroalgae of the portuguese coast.** J Phycol 47:1210-1218.

LOPES G, SOUSA C, VALENTÃO P, ANDRADE PB (2013) **Sterols in algae and health.** In: **Hernández-Ledezma B, Herrero M (eds) Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources.** John Wiley & Sons Ltd, Chichester, pp 173-191.

LÓPEZ-ALARCÓN, C., & DENICOLA, A. (2013). **Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays.** Analytica chimica acta, 763, 1-10.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F.; (2009). **O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência.** Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 214-222.

MARTINS, R. M., NEDEL, F., GUIMARÃES, V., DA SILVA, A. F., COLEPICOLO, P., DE PEREIRA, C. M., & LUND, R. G. (2018). **Macroalgae extracts from Antarctica have antimicrobial and anticancer potential.** Frontiers in microbiology, 9, 412.

MEDEIROS, A. da S. (2013) **Diversidade de macroalgas da Baía do Almirantado, ilha Rei George, Península Antártica, baseada em DNA barcoding e outros marcadores moleculares.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

MOHDALY, A. A., SARHAN, M. A., SMETANSKA, I., & MAHMOUD, A. (2010). **Antioxidant properties of various solvent extracts of potato peel, sugar beet pulp and sesame cake.** Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(2), 218-226.

MONTES, R. C. (2012). **Estudo fitoquímico da alga marinha Sargassum vulgare var. nanum E. de Paula (Sargassaceae) do litoral paraibano.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba. 115p.

NAHAS, R., ABATIS, D., ANAGNOSTOPOULOU, M. A., KEFALAS, P., VAGIAS, C., & ROUSSIS, V. (2007). **Radical-scavenging activity of Aegean Sea marine algae.** Food Chemistry, 102(3), 577-581.

NASIRI, M., SAEIDNIA, S., MASHINCHIAN-MORADI, A., & GOHARI, A. R. (2011). **Sterols from the red algae, Gracilaria salicornia and Hypnea flagelliformis, from Persian Gulf.** Pharmacognosy magazine, 7(26), 97.

NAUER, F., & LOPES FILHO, E. A. P. (2017) **Introdução às macroalgas marinhas. BOTÂNICA NO INVERNO 2017.** Organizadores Laboratório de Algas Marinhas, 15.

NOBMANN, P., SMITH, A., DUNNE, J., HENEHAN, G., & BOURKE, P. (2009) **The antimicrobial efficacy and structure activity relationship of novel carbohydrate fatty acid derivatives against *Listeria* spp. and food spoilage microorganisms**. International journal of food microbiology, v. 128, n. 3, p. 440-445.

O'NEILL, J. (2014) **Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations**. Rev. Antimicrob. Resist, v. 20, p. 1-16.

OLIVEIRA, G. L. S. (2015). **Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão**. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, 17(1), 36-44.

OUCIF, H., BENAÏSSA, M., ALI MEHIDI, S., PREGO, R., AUBOURG, S. P., & ABI-AYAD, S. M. E. A. (2020). **Chemical Composition and Nutritional Value of Different Seaweeds from the West Algerian Coast**. Journal of Aquatic Food Product Technology, 29(1), 90-104.

PACHECO, B. S., DOS SANTOS, M. A. Z., SCHULTZE, E., MARTINS, R. M., LUND, R. G., SEIXAS, F. K., ... & DE PEREIRA, C. M. P. (2018). **Cytotoxic activity of fatty acids from antarctic macroalgae on the growth of human breast cancer cells**. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 6, 185.

PALACIOS, M; CÁRDENAS, C. A.; NEWCOMBE, E. M (2015). **Macroalgas en arrecifes rocosos de Bahía Fildes y Collins, Isla Rey Jorge, Antártica**. Revista de biología marina y oceanografía, v. 50, n. 2, p. 359-366.

PATCH, C. S., TAPSELL, L. C., WILLIAMS, P. G., & GORDON, M. (2006). **Plant sterols as dietary adjuvants in the reduction of cardiovascular risk: theory and evidence**. Vascular health and risk management, 2(2), 157.

PATEL, K. M.; PATEL, J. K.; PATEL, M. P.; RAJPUT, G. C.; PATEL, H. A. 2010. **Introduction to hyphenated techniques and their application in pharmacy**. Pharmaceutical Methods, Bangalore, v. 1, n. 1.

PAUL, C., & POHNERT, G. (2011). **Production and role of volatile halogenated compounds from marine algae**. Natural product reports, 28(2), 186-195.

PAYGHAMI, N., JAMILI, S., RUSTAIYAN, A., SAEIDNIA, S., NIKAN, M., & GOHARI, A. R. (2015). **Alpha-amylase inhibitory activity and sterol composition of the marine algae, *Sargassum glaucescens***. Pharmacognosy research, 7(4), 314.

PERCOT A, GUVEN KC, AYSEL V, ERDUGAN H, GEZGIN T. (2009) **N-acetyltyramine from *Phyllophora crispa* (Hudson) P.S. Dixon and N-acetylphenylethylamine from *Gelidium crinale* (Hare ex Turner) Grailon**. Acta Pharm Sci 51:9–14.

PEREIRA, C. M., NUNES, C. F., ZAMBOTTI-VILLELA, L., STREIT, N. M., DIAS, D., PINTO, E., ... & COLEPICOLO, P. (2017). **Extraction of sterols in brown macroalgae from Antarctica and their identification by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.** Journal of Applied Phycology, 29(2), 751-757.

PEREIRA, H., BARREIRA, L., FIGUEIREDO, F., CUSTÓDIO, L., VIZETTO-DUARTE, C., POLO, C., ... & VARELA, J. (2012). **Polyunsaturated fatty acids of marine macroalgae: potential for nutritional and pharmaceutical applications.** Marine drugs, 10(9), 1920-1935.

PERES, J. C. F., CARVALHO, L. R. D., GONÇALEZ, E., BERIAN, L. O. S., & FELICIO, J. D (2012). **Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts.** Ciência e Agrotecnologia, v. 36, n. 3, p. 294-299.

PERES, T. B. (2002). **Noções básicas de cromatografia.** Biológico, São Paulo, v. 64, n. 2, p. 227-229.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. (2006). **Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays.** Food Research International, v.39, p.791-800.

PINHO, G. P., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L., & SILVÉRIO, F. O. (2009). **Matrix effect in pesticide quantification by gas chromatography.** Química Nova, 32(4), 987-995.

PLAZA, M., CIFUENTES, A., & IBÁÑEZ, E. (2008). **In the search of new functional food ingredients from algae.** Trends in Food Science & Technology, 19(1), 31-39.

PLAZA, M., SANTOYO, S., JAIME, L., REINA, G. G. B., HERRERO, M., SEÑORÁNS, F. J., & IBÁÑEZ, E.(2010) **Screening for bioactive compounds from algae.** Journal of pharmaceutical and biomedical analysis, v. 51, n. 2, p. 450-455.

RAUTENBERGER, Ralf; HUOVINEN, Pirjo; GÓMEZ, Iván. (2015) **Effects of increased seawater temperature on UV tolerance of Antarctic marine macroalgae.** Marine Biology, v. 162, n. 5, p. 1087-1097.

RICKER RW (1987) **Taxonomy and Biogeography of Macquarie Island Seaweeds.** British Museum (Natural History), London, pp. 344.

ROCHA, F. D., PEREIRA, R. C., KAPLAN, M. A. C., & TEIXEIRA, V. L.(2007) **Natural products from marine seaweeds and their antioxidant potential.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 4, p. 631-639.

SAEIDNIA, S., MANAYI, A., GOHARI, A. R., & ABDOLLAHI, M. (2014). **The story of beta-sitosterol-a review.** European Journal of Medicinal Plants, 590-609.

SÁNCHEZ-MACHADO DI, LÓPEZ-HERNÁNDEZ J, PASEIRO-LOSADA P, LÓPEZ-CERVANTES J (2004) **An HPLC method for the quantification of sterols in edible seaweeds**. Biomed Chromatogr 18:183-190.

SÁNCHEZ-MORENO, C.(2002) **Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems**. Food Science and Technology International, v.8, p.121-137.

SANTOS, M. A., COLEPICOLO, P., PUPO, D., FUJII, M. T., DE PEREIRA, C. M., & MESKO, M. F. (2017). **Antarctic red macroalgae: a source of polyunsaturated fatty acids**. Journal of Applied Phycology, 29(2), 759-767.

SANTOS, S. A., OLIVEIRA, C. S., TRINDADE, S. S., ABREU, M. H., ROCHA, S. S., & SILVESTRE, A. J. (2016). **Bioprospecting for lipophilic-like components of five Phaeophyta macroalgae from the Portuguese coast**. Journal of Applied Phycology, 28(5), 3151-3158.

SANTOS, S. A., VILELA, C., FREIRE, C. S., ABREU, M. H., ROCHA, S. M., & SILVESTRE, A. J. (2015). **Chlorophyta and Rhodophyta macroalgae: A source of health promoting phytochemicals**. Food chemistry, 183, 122-128.

SAVOIA, D. (2012) **Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics**. Future Medicine-Future Microbiology, v.07, n. 08, p. 979-990.

SCHOENROCK, K. M., SCHRAM, J. B., AMSLER, C. D., MCCLINTOCK, J. B., & ANGUS, R. A. (2015). **Climate change impacts on overstory Desmarestia spp. from the western Antarctic Peninsula**. Marine Biology, 162(2), 377-389.

SHANMUGHAPRIYA, S., MANILAL, A., SUJITH, S., SELVIN, J., KIRAN, G. S., & NATARAJASEENIVASAN, K. (2008). **Antimicrobial activity of seaweeds extracts against multiresistant pathogens**. Annals of Microbiology, 58(3), 535-541.

SILVA, G. C., ALBUQUERQUE-COSTA, R., OLIVEIRA-PEIXOTO, J. R., PESSOA-NASCIMENTO, F. E., DE MACEDO-CARNEIRO, P. B., & SILVA DOS FERNANDES-VIEIRA, R. H. (2013) **Macroalgas marinas tropicales atlánticas con actividad biológica contra vibrios virulentos y resistentes a antimicrobianos**. Latin american journal of aquatic research, v. 41, n. 1, p. 183-188.

SILVA, G. C., ALBUQUERQUE-COSTA, R., OLIVEIRA-PEIXOTO, J. R., PESSOA-NASCIMENTO, F. E., DE MACEDO-CARNEIRO, P. B., & DOS FERNANDES-VIEIRA, R. H. S. (2013) **Tropical Atlantic marine macroalgae with bioactivity against virulent and antibiotic resistant Vibrio/Macroalgas**

marinas tropicales atlánticas con actividad biológica contra vibrios virulentos y resistentes a antimicrobianos. Latin American Journal of Aquatic Research, v. 41, n. 1.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; GOSMANN,G.; MENTZ,L.A.; PETROVICZ, P.R. (2010) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6ª ed.- Porto Alegre: Ed da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC.

SUN, S. M., CHUNG, G. H., & SHIN, T. S. (2012). **Volatile compounds of the green alga, *Capsosiphon fulvescens*.** Journal of applied phycology, 24(5), 1003-1013.

TEIXEIRA TR, SANTOS GS, TURATTI ICC, PAZIANI MH, VON ZESKA KRESS MR, COLEPICOLO P, DEBONSI HM (2019) **Characterization of the lipid profile of Antarctic brown seaweeds and their endophytic fungi by Gas Chromatography–Mass spectrometry (GC–MS).** Polar Biol 42:1431–1444.

TELLEZ, M. R., SCHRADER, K. K., & KOBASISY, M. (2001). **Volatile components of the cyanobacterium *Oscillatoria perornata* (Skuja).** Journal of agricultural and food chemistry, 49(12), 5989-5992.

TENORIO-RODRIGUEZ, P. A., MURILLO-ÁLVAREZ, J. I., CAMPA-CORDOVA, Á. I., & ANGULO, C. (2017). **Antioxidant screening and phenolic content of ethanol extracts of selected Baja California Peninsula macroalgae.** Journal of food science and technology, 54(2), 422-429.

TORRES, P., NOVAES, P., FERREIRA, L. G., SANTOS, J. P., MAZEPA, E., DUARTE, M. E. R., ... & DOS SANTOS, D. Y. (2018). **Effects of extracts and isolated molecules of two species of Gracilaria (Gracilariales, Rhodophyta) on early growth of lettuce.** Algal research, 32, 142-149.

TORRES, P., SANTOS, J. P., CHOW, F., & DOS SANTOS, D. Y. (2019). **A comprehensive review of traditional uses, bioactivity potential, and chemical diversity of the genus Gracilaria (Gracilariales, Rhodophyta).** Algal Research, 37, 288-306.

VIDOTTI, E; ROLLEMBERG, M.(2004) **Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica.** Química Nova, v. 27, p. 139 – 145.

VILLARREAL, P., CARRASCO, M., BARAHONA, S., ALCAÍNO, J., CIFUENTES, V., & BAEZA, M. (2018). **Antarctic yeasts: analysis of their freeze-thaw tolerance and production of antifreeze proteins, fatty acids and ergosterol.** BMC microbiology, 18(1), 66.

VILLARREAL-GÓMEZ, L. J., SORIA-MERCADO, I. E., GUERRA-RIVAS, G., & AYALA-SÁNCHEZ, N. E.(2010) **Actividad anticancerígena y antibacteriana**

de macroalgas y bacterias asociadas a su superficie. Revista de biología marina y oceanografía, v. 45, n. 2, p. 267-275.

VOLKMAN JK (2003) **Sterols in microorganisms.** Appl Microbiol Biotechnol 60:495–506.

WIDHALM, J. R., & DUDAREVA, N. (2015). **A familiar ring to it: biosynthesis of plant benzoic acids.** Molecular plant, 8(1), 83-97.

WIENCKE C, CLAYTON MN (2002) **Antarctic Seaweeds.** A.R.G. Gantner-Verlag: Lichtenstein, pp 1-239.

WIENCKLE C, AMSLER CD, CLAYTON MN (2014) **Macroalgae.** In: De Broyer C, Koubbi P, Griffiths HJ, Raymond B, Udekem d'Acoz Cd', Van de Putte, AP, Danis B, David B, Grant S, Gutt J, Held C, Hosie G, Huettmann F, Post A, Ropert-Coudert Y (eds) **Biogeographic Atlas of the Southern Ocean**, 1st edn. Scientific Committee on Antarctic Research Cambridge, pp 66-73.

XUE C-H, FANG Y, LIN H, CHEN L, LI Z-J, DENG D, LU C-X (2001). **Chemical characters and antioxidative properties of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*.** J Appl Phycol 13: 67-70.

XUE C-H, YU G, HIRATA T, TERAOKA J, LIN H (1998). **Antioxidative activities of several marine polysaccharides evaluated in a phosphatidylcholine-liposomal suspension and organic solvents.** Biosci Biotech Bioch 62: 206-209.

YAMAMOTO, M., BALDERMANN, S., YOSHIKAWA, K., FUJITA, A., MASE, N., & WATANABE, N. (2014). **Determination of volatile compounds in four commercial samples of Japanese green algae using solid phase microextraction gas chromatography mass spectrometry.** The Scientific World Journal, 2014.

YAN X, XIANGCUI L, CHENGXU Z, XIAO F (1996). **Prevention of fish oil rancidity by phlorotannins from *Sargassum kjellmanianum*.** J Appl Phycol 8: 201-203.

YAO, J., & ROCK, C. O.(2017) **Bacterial fatty acid metabolism in modern antibiotic discovery.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids, v. 1862, n. 11, p. 1300-1309.

YOUNG RM, VON SALM JL, AMSLER MO, LOPES-BAUTISTA J, AMSLER CD, MCCLINTOCK JB, BAKER BJ (2013) **Site-Specific Variability in the Chemical Diversity of the Antarctic Red Alga *Plocamium cartilagineum*.** Mar. Drugs 11:2126-2139. ZHANG, H.,

ZHANG, L., PENG, L. J., DONG, X. W., WU, D., WU, V. C. H., & FENG, F. Q. (2012). **Quantitative structure-activity relationships of antimicrobial fatty**

acids and derivatives against *Staphylococcus aureus*. Journal of Zhejiang University Science B, v. 13, n. 2, p. 83-93.

ZUBIA, M., FABRE, M. S., KERJEAN, V., LE LANN, K., STIGER-POUVREAU, V., FAUCHON, M., & DESLANDES, E. (2009). **Antioxidant and antitumoural activities of some Phaeophyta from Brittany coasts.** Food Chemistry, 116(3), 693-701.

ZUBIA, M., ROBLEDO, D., & FREILE-PELEGRIN, Y. (2007). **Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico.** Journal of applied phycology, 19(5), 449-458.