

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e
Bioprospecção



Dissertação

Esteróis de Macroalgas *Phaeophyceae* da Antártica:
Extração e Análise por Métodos Cromatográficos

Camila Francine Paes Nunes

Pelotas, 2015

Camila Francine Paes Nunes

**Esteróis de Macroalgas *Phaeophyceae* da Antártica:
Extração e Análise por Métodos Cromatográficos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Claudio Martin Pereira de Pereira

Co-orientadora: Daiane Dias

Pelotas, 2015

Catálogo na fonte:

Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

N972e Nunes, Camila Francine Paes

Esteróis de macroalgas *Phaeophyceae* da
Antártica: extração e análise por métodos
cromatográficos / Camila Francine Paes Nunes;
Claudio Martin Pereira de Pereira, orientador;
Daiane Dias, coorientadora — Pelotas, 2015.

Universidade Federal de Pelotas

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
CENTRO DE CIÊNCIAS QUÍMICAS, FARMACÊUTICAS E DE ALIMENTOS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação de Mestrado

**Esteróis de Macroalgas *Phaeophyceae* da Antártica:
Extração e Análise por Métodos Cromatográficos**

elaborada por
Camila Francine Paes Nunes

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção)

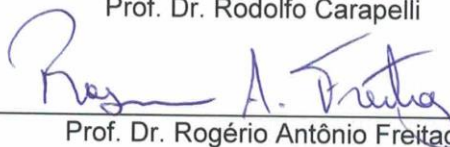
COMISSÃO EXAMINADORA:



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



Prof. Dr. Rodolfo Carapelli



Prof. Dr. Rogério Antônio Freitag

Prof. Dr. Wilson João Cunico Filho

Pelotas, 2015

Agradecimentos

Ao finalizar este trabalho gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma me ajudaram a torna-lo possível.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus, por me permitir existir, por estar sempre ao meu lado obstinando a persistir, sonhar e concluir.

Ao meu companheiro Gabriel, gostaria de agradecer de todo o meu coração pelo seu amor, por estar sempre ao meu lado, pelas palavras de incentivo e também pela compreensão nos momentos de minha ausência.

A minha mãe Claudia, gostaria de expressar a minha profunda gratidão pelo carinho, educação e apoio em todas as decisões de minha vida.

As minhas irmãs, Tamara e Bruna, pela torcida de sempre e pelo grande amor que tem por mim.

Ao meu orientador Prof. Dr. Claudio M. P. de Pereira, pela forma como me orientou e pela disponibilidade que sempre demonstrou e sua dedicação durante todo o doutorado. Obrigada por ter me recebido tão bem, por ter acreditado em mim e por todos os ensinamentos científicos, pela oportunidades, atenção, carinho e conselhos.

A minha co-orientadora Prof^a Dr^a Daiane Dias, pela co-orientação e apoio que sempre me disponibilizou, pelas discussões científicas com enorme dedicação e paciência e suas sugestões que foram muito importantes para a elaboração deste trabalho.

A minha grande amiga Bruna Pacheco, pela amizade, companheirismo, por me incentivar com a sua palavra amiga e o seu grande bom humor, que foram muito importantes.

A minha querida amiga Rosiane, pela amizade, parceria, pelo conhecimento e pela sua disponibilidade nos momentos que sempre precisei. Pelas longas horas de risadas que tornaram os meus dias ainda mais agradáveis.

Aos meus colegas do laboratório de Lipidômica e Bio-orgânica, que ao longo destes anos trabalharam comigo. Muito obrigada pela dedicação, companheirismo e pelos bons momentos que vocês me proporcionaram: Bruno Rosa, Caroline Carapina, Caroline Tuchtenhagen, Guília, Marina, Marco, Silvana e Vinicius. Também gostaria de agradecer em especial André, que é o técnico do nosso laboratório, por ter apoiado o meu trabalho, me ajudado quando precisei e por ter me dado todo o suporte nas análises cromatográficas.

As minhas amigas Adriana, Bruna Bento e Dani do Laboratório de Química Aplicada a Bioativos pela amizade e pelos vários momentos de alegria compartilhados.

Ao Prof. Dr. Pio Colepicolo, coordenador do projeto Monitoramento Antártico/PROANTAR, pela oportunidade de participar desse grande projeto. E também gostaria de agradecer-lo pela oportunidade que me concedeu de realizar parte do meu trabalho em seu Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, e ao técnico Leonardo Villela pela ajuda nas análises cromatográficas.

À Prof^a Dr^a Mutue Fujii do Instituto de Botânica da Universidade de São Paulo e a Prof^a. Dr^a. Franciane Pellizzari do Laboratório de Ficologia e Qualidade de Água Marinha da Universidade Estadual do Paraná, pela ajuda na identificação das algas.

Aos professores do curso por compartilhar o vasto conhecimento.

A todos os colegas do Mestrado pela boa convivência durante as disciplinas.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Wilson Cunico, e ao Christian M. Geisler, secretário do curso, pela atenção e presteza.

À Banca Examinadora dessa dissertação pela disponibilidade e colaboração.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo auxílio financeiro sob a forma de concessão de bolsa de doutorado

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda
pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”
(Arthur Schopenhauer)

PARTE I

Resumo

NUNES, Camila Francine Paes Nunes. **Esterois de Macroalgas *Phaeophyceae* da Antártica: Extração e Análise por Métodos Cromatográficos**. 2015. 71f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A região Antártica é caracterizada por grande diversidade de macroalgas *Phaeophyceae*, no entanto, até o presente momento, a literatura possui poucas informações a respeito das moléculas bioativas presentes nessas macroalgas. O presente estudo propôs uma nova metodologia para a extração de esteróis presentes na macroalga parda *Desmarestia anceps*. A nova metodologia de extração, empregando o ultrassom em temperatura ambiente, demonstrou ser mais eficiente para a extração dessas moléculas, quando comparada a outras metodologias descritas na literatura (extrações com a agitação magnética e irradiação micro-ondas). Os extratos obtidos foram analisados por cromatografia gasosa, com detector de ionização em chama (CG/FID) e cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/MS), permitindo a identificação e quantificação de sete esteróis (brassicasterol, campesterol, colesterol, ergosterol, estigmasterol, fucosterol e β -sitosterol) presentes nas macroalgas. A metodologia de extração mostrou uma eficiência quando comparadas com as demais técnicas propostas, com taxas de recuperação de extração obtidas em 20 minutos e amplitude de 40% na extração. A metodologia de extração via ultrassom proposta foi aplicada em seis espécies de macroalgas pardas originárias da Antártica: *Adenocystis ultricularis*, *Ascoseira mirabilis*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia Antarctic* e *Hymantothallus grandifolius*. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a espectrômetro de massas, com ionização química a pressão atmosférica (HPLC/APCI-MS/MS), permitindo a identificação e quantificação dos esteróis presentes nas seis macroalgas pardas. Dentre os esteróis analisados, o fucosterol apresentou os maiores teores nas macroalgas, seguido do Estigmasterol e β -sitosterol. O campesterol foi o esteroide encontrado em menor proporção nas macroalgas pardas. A macroalga *H. grandifolius* exibiu a maior concentração de esteróis e a alga *D. Antarctic* apresentou a menor concentração de esteróis em sua composição. Os dados obtidos demonstram que o perfil de esteróis das macroalgas pardas da Antártica são promissores, para um posterior isolamento desses compostos com o fucosterol, Estigmasterol e β -sitosterol que têm um grande potencial terapêutico e biológico.

Palavras-chave: Macroalgas parda; Antártica; Ultrassom; Esteróis; Fitoesteróis.

Abstract

NUNES, Camila Francine Paes Nunes. **Sterols of Macroalgae *Phaeophyceae* Antarctica: Extraction and Analysis Chromatographic Methods**. 2015. 71f. Thesis (Master) - Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The Antarctic region is characterized by great diversity of *Phaeophyceae* macroalgae, however, to date, little information about the bioactive molecules present in these macroalgae is available in the current literature. This study proposed a new methodology for the extraction of sterols present in *Desmarestia anceps* brown macroalgae. The new method of extraction by ultrasound at room temperature, proved to be more efficient to extract these molecules compared to other methods described in the literature (extractions with magnetic stirring and microwave irradiation). The extracts obtained were analyzed by gas chromatography with flame ionization detection (GC/FID) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS), making possible the identification and quantification of seven sterols (brassicasterol, campesterol, cholesterol, ergosterol, stigmasterol, β -sitosterol and fucosterol) present in the macroalgae. The extraction methodology proved to be efficient when compared with the other proposed techniques, with extraction recovery rates obtained in 20 minutes and an amplitude of 40% in the extraction. The ultrasound extraction methodology proposed was applied in six species of brown macroalgae originating in the Antarctic: *Adenocystis ultricularis*, *Ascoseira mirabilis*, *Cystosphaera jacquiniotii*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia Antarctic* and *Hymantothallus grandifolius*. The extracts were analyzed by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS), allowing the identification and quantification of sterols present in six brown macroalgae. Among the analyzed sterols, fucosterol presented the highest levels in the macroalgae, followed by stigmasterol and β -sitosterol. Campesterol was the sterol found in the lowest proportion in brown macroalgae. The macroalgae *H. grandifolius* exhibited the highest concentration of sterols and the algae *D. Antarctic* had the lowest concentration of sterols in its composition. The data obtained show that the sterol profile of Antarctica brown macroalgae is promising, for further isolation of these compounds with fucosterol, stigmasterol and β -sitosterol which have a great therapeutic and biological potential.

Keywords: Marine brown algae. Antarctic regions. Ultrasound. Sterols. Phytosterols

Lista de Figuras

Figura 1 – Macroalgas do filo <i>Chlorophyta</i> (a) <i>Prasiola crista</i> , (b) <i>Acrosiphonia arcta</i>	19
Figura 2 – Macroalgas do filo <i>Rodophyta</i> . (a) <i>Palmaria decipiens</i> , (b) <i>Irideae cordata</i> , (c) <i>Georgiella sp.</i> , (d) <i>Pyropia endiviifolium</i> , (e) <i>Plocamium cartilagineum</i>	20
Figura 3 – Macroalgas do filo <i>Ochrophyta</i> . (a) <i>Ascoseira mirabilis</i> , (b) <i>Adenocystis utricularis</i> , (c) <i>Himantothallus grandifolius</i>	21
Figura 4 – Continente Antártico	22
Figura 5 – Localização da estação de pesquisa antártica brasileira e outras estações de pesquisa internacionais na Ilha Rei George	23
Figura 6 – Macroalga <i>Adenocystis utricularis</i>	25
Figura 7 – Macroalga <i>Ascoseira mirabilis</i>	25
Figura 8 – Macroalga <i>Cystosphaera jacquinotii</i>	26
Figura 9 – Macroalga <i>Desmarestia anceps</i>	27
Figura 10 – Macroalga <i>Desmarestia antarctica</i>	28
Figura 11 – Macroalga <i>Himantothallus grandifolius</i>	29
Figura 12 – Principais estruturas químicas dos esteróis, (1) colesterol, (2) estigmasterol, (3) sitosterol e (4) campesterol	30
Figura 14 - Estrutura básica dos esteróis.....	32

Lista de Abreviaturas e siglas

C	Carbono
CG/FID	Cromatografia gasosa com detector de ionização em chama
CG/MS	Cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massas
Cm	Centímetros
EACF	Estação Antártica Comandante Ferraz
FL-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência
FTIR	Espectroscopia de infravermelho
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Km	Quilômetros
Km ²	Quilômetros quadrados
LC-MS/MS	Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro de Massa
MEP/DOXP	2-C-metil-D-eritritolo-4-fosfato/1-deossi-D-xilulosio-5-fosfato
M	Metro
Min	Minutos
MVA	Mevalonato
NIRS	Espectroscopia de infravermelho próximo
SMT	Esterol metiltransferase
PROANTAR	Programa Antártico Brasileiro
RMN	Ressonância magnética nuclear
RP-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa
TMS	Trimetilsililéteres
UV-HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de luz ultravioleta

Lista de Símbolos

B	Letra grega beta
Δ	Letra grega delta
%	Percentual
®	Marca Registrada

Sumário

1 Introdução	17
2 Objetivos	18
Objetivo Geral.....	18
Objetivos Específicos	18
3 Revisão de literatura.....	19
Algas	19
Ambiente Antártico.....	22
Macroalgas do Continente Antártico	23
Caracterização e Classificação das espécies <i>Adenocystis ultricularis</i> , <i>Ascoseira mirabilis</i> , <i>Cystosphaera jacquiniotii</i> , <i>Desmarestia anceps</i> , <i>Desmarestia antarctic</i> e <i>Hymantothallus grandifolius</i>	24
Macroalga <i>Adenocystis ultricularis</i> (Bory de Saint-Vincent) Skottsberg	24
Macroalga <i>Ascoseira mirabilis</i> (Skottsberg)	25
Macroalga <i>Cystosphaera jacquiniotii</i> (Montagne) Skottsberg	26
Macroalga <i>Desmarestia anceps</i> (J.V.Lamouroux)	27
Macroalga <i>Desmarestia antarctica</i> (R.L.Moe & P.C.Silva)	27
Macroalga <i>Hymantothallus grandifolius</i> , (A.Gepp & E.S.Gepp) Zinova	28
Fitoesteróis.....	29
Esteróis em Algas.....	32
Métodos de Extração de Esteróis de Algas	33
Métodos de Análise de Esteróis	35
4 Artigo científico.....	39

Artigo 1	39
5 Conclusão	62
6 Referências	63
Anexo a	71

PARTE II

1 Introdução

As algas são um grupo heterogêneo de organismos, que realizam fotossíntese, e apresentam diferentes origens, linhas evolutivas e bioquímicas (Lee, 2008). Cerca de 30.000 espécies de algas são encontradas em todo o mundo com diferentes formas e tamanhos, desde organismos unicelulares (microalgas) à organismos marinhos multicelulares (macroalgas), sendo encontradas tanto no ecossistema aquático, quanto no terrestre (Bhakuni e Rawat, 2005; Dominguez, 2013; Kumari *et al.*, 2013).

As macroalgas são tradicionalmente classificadas de acordo com sua morfologia e características químicas, como a presença de pigmentos específicos, que definem as principais classificações das algas: *Ochrophyta* (algas pardas), *Chlorophyta* (algas verdes) ou *Rhodophyta* (algas vermelhas) (Leal *et al.*, 2013). As algas pardas são uma classe composta principalmente por macroalgas marinhas, que são comumente encontradas em mares das regiões temperadas frias e polares (Silberfeld *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2011).

Os metabólitos bioativos presentes em algas marinhas podem ser apresentados na forma de heterocíclios, ácidos graxos, esteróis, terpenos, polissacarídeos, peptídeos, proteínas e compostos fenólicos (Bhakuni e Rawat, 2005; Leal *et al.*, 2013). Os esteróis mais encontrados nas algas são o colesterol, fucosterol, isofucosterol, clionosterol e diidroxiesterol (Kumari *et al.*, 2013).

Os esteróis apresentam efeitos benéficos ao ser humano, tais como a redução dos níveis de colesterol e também demonstraram resultados promissores como antidiabético, anti-inflamatório, antioxidante e anticarcinogênico (Louw *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Mackay e Jones, 2012; Ma *et al.*, 2013).

Com um real interesse nos fitoesteróis e sua aplicabilidade, vários métodos de extração foram propostos. Dentre os métodos encontram-se a prensagem, a agitação magnética, o uso de soxhlet e micro-ondas (Mercer e Armenta, 2011; De Boer *et al.*, 2012; Kumari *et al.*, 2013). Cabe ressaltar que a maioria das algas apresentam uma parede celular espessa, fazendo com que o contato do solvente com os lipídios presentes no interior desta membrana seja limitado, sendo necessária uma pesquisa mais aprofundada de novas metodologias (Dos Santos *et al.*, 2014).

2 Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo geral consiste no desenvolvimento de uma metodologia eficiente para a extração e aplicação da cromatografia como ferramenta na identificação de esteroides de macroalgas Antárticas.

Objetivos Específicos

- i. Desenvolver uma metodologia de extração via ultrassom;
- ii. Avaliar as melhores condições operacionais de tempo e amplitude do ultrassom para a extração dos esteroides de seis espécies de macroalgas *Phaeophyceae* da Antártica;
- iii. Comparar as técnicas propostas para a extração de esteroides com os métodos convencionais descritos na literatura (agitação e micro-ondas);
- iv. Caracterizar e quantificar os esteroides por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama (CG/FID);
- v. Caracterizar e quantificar os esteroides por Cromatografia Gasosa Acoplada a um Espectrômetro de Massas (CG/MS);
- vi. Caracterizar e quantificar os esteroides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massa (LC-MS/MS).

3 Revisão de Literatura

Algas

Atualmente os macro e micro-organismos marinhos, tem sido objeto de pesquisa, devido a importante contribuição destes organismos como fonte de compostos bioativos, de grande significado para as indústrias farmacêutica e de alimentos (Dominguez, 2013; Vaske e Crews, 2014).

As algas são organismos fotossintetizantes que, durante seu curso evolutivo, desenvolveram grande diversificação anatômica e morfológica. Elas podem variar em tamanhos, desde 1 micrômetro de diâmetro até 60 metros de comprimento, sendo classificadas como microalgas e macroalgas. Podem viver em ambientes aquáticos diferentes (marinho e de água doce) ou ainda terrestre (Molinski *et al.*, 2009).

As algas são classificadas em três diferentes reinos: monera, protista e plantae; ou ainda com diferentes denominações em outros sistemas, baseado em dados de biologia molecular (Raven *et al.*, 2007). O reino monera é constituído pelas cianobactérias (algas azuis) ou prochlorophytes, que são seres unicelulares, procariontes e autótrofos. Os organismos do reino protista são unicelulares e alguns poucos organismos podem apresentar forma pluricelular de organização simples, autótrofos ou heterótrofos. No reino plantae os organismos são pluricelulares, eucariontes e autótrofos (Vidotti e Rollemberg, 2004; Gould, 2012). Este reino é composto pelas macroalgas, que são divididas em três filos principais: *Ochrophyta*, *Chlorophyta* ou *Rhodophyta*, dependendo de seus nutrientes, pigmentos e composição química. O filo *Chlorophyta* é composto pelas algas verdes (**Figura 1**) extremamente abundantes nos ambientes aquáticos. As algas verdes contêm clorofilas *a* e *b*, carotenóides e xantofilas (Lourenço, 2006).

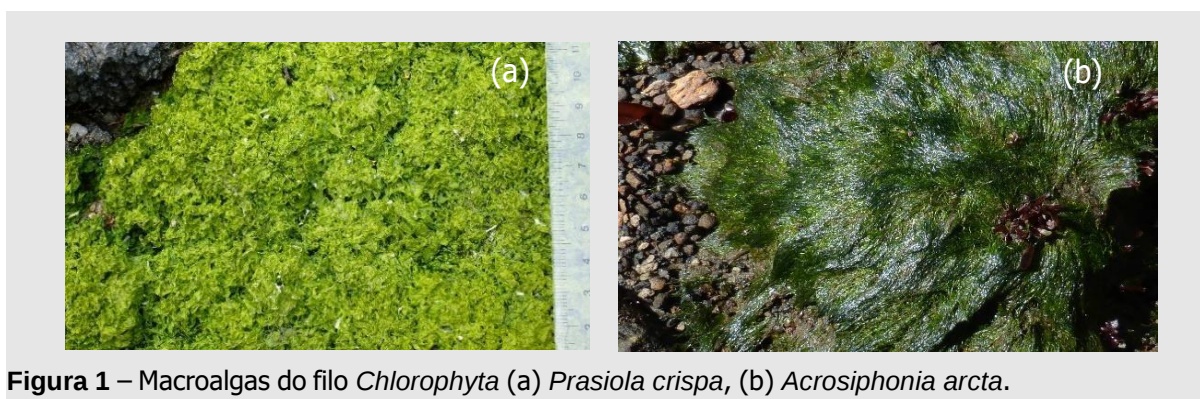


Figura 1 – Macroalgas do filo *Chlorophyta* (a) *Prasiola crispa*, (b) *Acrosiphonia arcta*.

O filo *Rhodophyta* é constituído pelas algas vermelhas (**Figura 2**), as quais podem viver desde a zona superior da região entre marés até grandes profundidades,

onde há registros de uma espécie que vive numa profundidade de 280m, na região das Bahamas. Elas apresentam clorofilas *a* e *d*, carotenoides, ficocianina, aloficocianina e ficoeritrina-b, responsável pela cor avermelhada (Vidotti e Rollemberg, 2004; Lopes *et al.*, 2011).

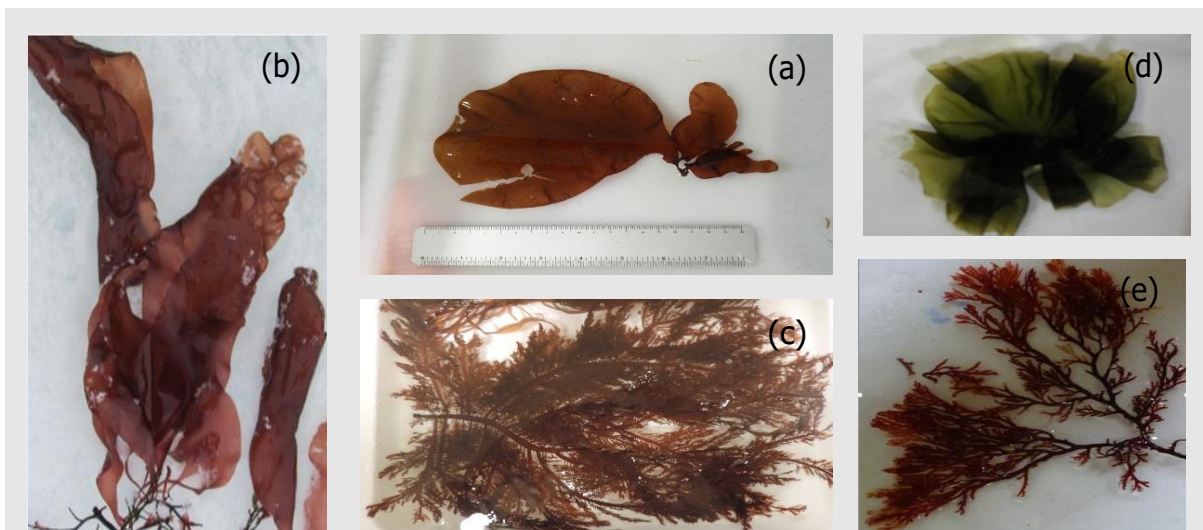


Figura 2 – Macroalgas do filo Rodophyta. (a) *Palmaria decipiens*, (b) *Irideae cordata*, (c) *Georgiella sp.*, (d) *Pyropia endiviifolium*, (e) *Plocamium cartilagineum*.

O filo *Ochrophyta* é compreendido pelas algas pardas (**Figura 3**), que podem atingir mais de 25 m e formar densas florestas marinhas, conhecidas como kelps (Leal *et al.*, 2013). As algas pardas são encontradas nos mares das regiões temperadas frias e polares, sendo apenas cinco espécies encontradas em água doce (*Bodenella*, *Heribaudiella*, *Lithoderma*, *Pheurocladia* e *Sphacelaria*) (Lourenço, 2006). As algas pardas são constituídas de clorofilas *a*, *c1*, *c2*, β -caroteno, violaxantina e fucoxantina, sendo esta a responsável pela pigmentação marrom característica das algas desse filo. Por serem geralmente de ambiente frio, as algas pardas sintetizam substâncias de baixa massa molecular, como o manitol, o glicerol e a sacarose, que são estruturas com funções crioprotetoras e estabilizantes osmóticos (Lourenço, 2006; Lopes *et al.*, 2011).

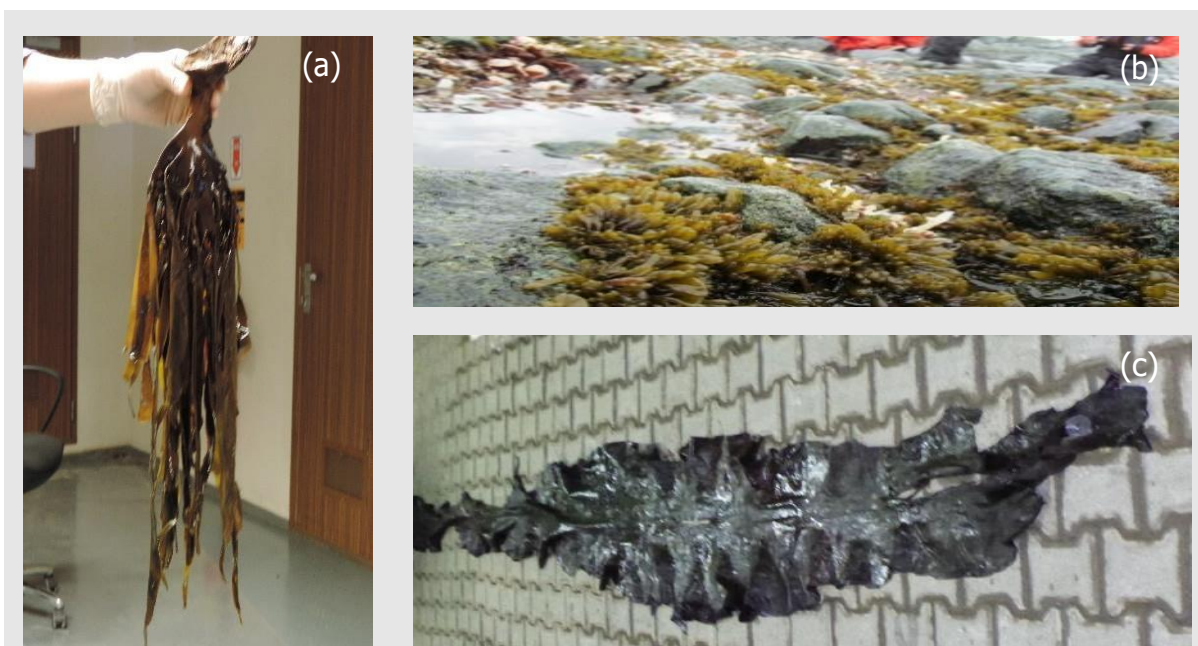


Figura 3 – Macroalgas do filo *Ochrophyta*. (a) *Ascoseira mirabilis*, (b) *Adenocystis utricularis*, (c) *Himantothallus grandifolius*.

As algas são seres capazes de ocupar os mais variados *habitats*, assim, elas podem ser encontradas em águas doces, água do mar, sobre os solos úmidos ou até mesmo sobre a neve (Molinski *et al.*, 2009). As algas microscópicas podem crescer em suspensão na água, enquanto as algas neustônicas crescer sobre a superfície da água. As algas criófilas se desenvolvem sobre a neve e gelo; já as algas termófilas, edáficas e epilíticas vivem em fontes termais, sobre o solo e em rochas, respectivamente. Devido a sua capacidade de se desenvolver em ambientes tão diversos e extremos, elas produzem uma matriz de bioativos únicos e complexos (Kumari *et al.*, 2013).

As macroalgas tem sido o foco de vários estudos, devido a sua capacidade de biossintetizar metabólitos com atividades biológicas; como carotenoides, os aminoácidos, terpenos, fenóis, ácidos graxos e fitoesteróis (Molinski *et al.*, 2009). As macroalgas pardas são de grande interesse devido a uma variedade de lipídios de interesse farmacêutico, como os ácidos graxos poli-insaturados, glicolípids, fucoxantina, polifenóis e esteróis (Gerasimenko *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2013). São grandes produtoras de alginatos e a aplicação desses compostos é bastante variada e muito promissora, devido ao seu valor comercial, por ser de grande interesse pelas indústrias de cosméticos, alimentos e produtos farmacêuticos (Dominguez, 2013).

Ambiente Antártico

O continente antártico está localizado na região polar austral dentro do círculo polar com uma área aproximada de 14 milhões de km², banhado pelos oceanos Atlântico, Pacífico e Índico, conhecido como Confluência Antártica (**Figura 4**). Aproximadamente 95% do território são cobertos por gelo com camadas que chegam a 2700m de espessura. Esta região está dividida em duas partes importantes, em relação ao meridiano de Greenwich, a Antártica Oriental, onde ocorrem paredões de gelo e a Antártica Ocidental formada, principalmente, por arquipélagos de ilhas, unidas entre si por grandes extensões de gelo (Rosa *et al.*, 2006).

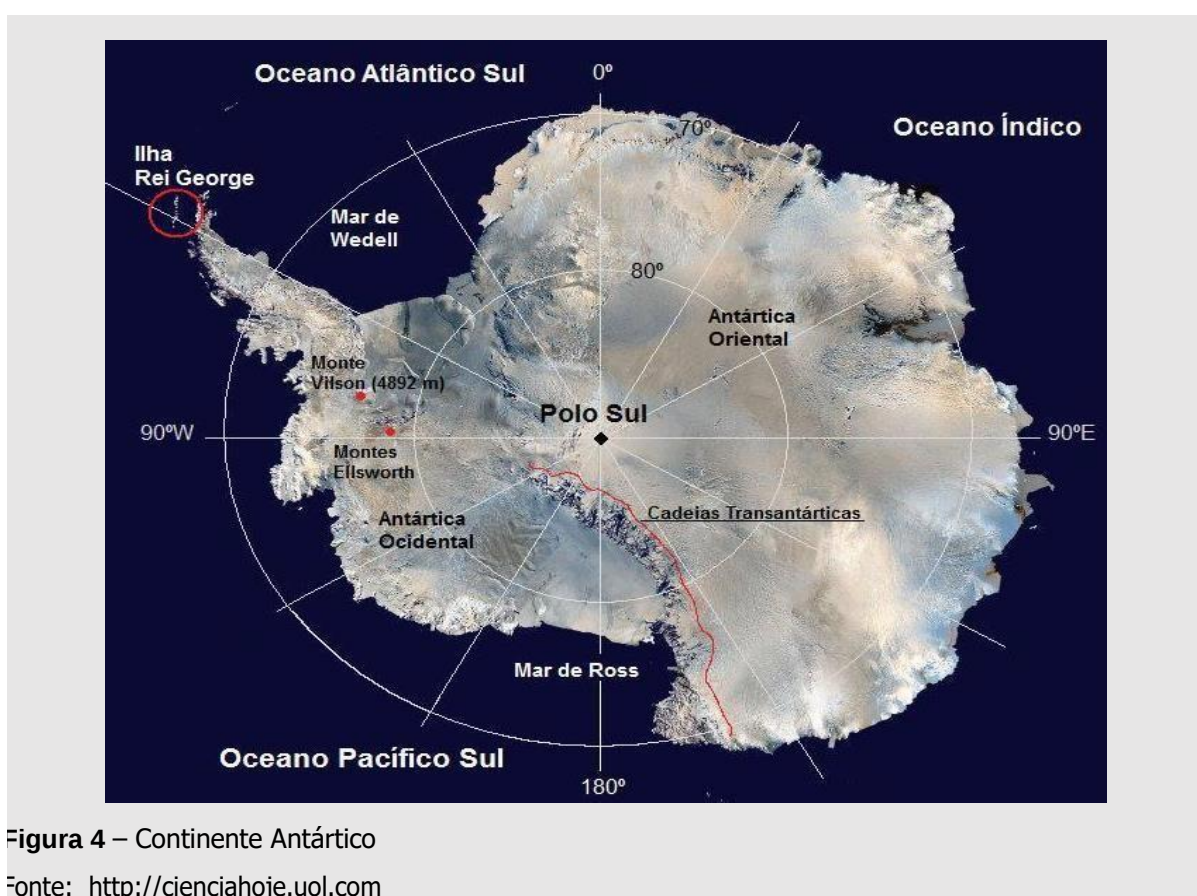


Figura 4 – Continente Antártico

Fonte: <http://cienciahoje.uol.com>

A maioria dos organismos do Oceano Antártico são espécies endêmicas, com características ecofisiológicas únicas, resultante de uma longa história evolutiva de forma isolada (Nędzarek, 2008). Esse ambiente abiótico caracterizado por apresentar uma cadeia alimentar restrita, sendo a principal delas os micro-organismos (Godinho *et al.*, 2013). São organismos com características únicas, por sobreviverem a extremas condições ambientais, como longos períodos de exposição a luz solar e baixas temperaturas, ciclos de congelamento e descongelamento, altas concentrações de irradiação ultravioleta, zoneamento de profundidade distintas,

biogeografia e biodiversidade de espécies algas bentônicas. Em especial as algas bentônicas se caracterizam por se desenvolver no fundo do mar, despertado o interesse para o desenvolvimento de pesquisas no continente Antártico, que surgiu na década de 50, quando 55 estações se instalaram no continente e ilhas subantárticas (Bargagli, 2008; Zacher *et al.*, 2009)).

Em 1975 o Brasil aderiu ao Protocolo do Tratado da Antártica e no ano de 1982 criou o Programa Antártico Brasileiro (PROANTAR) que deu início ao desenvolvimento de pesquisas polares no continente antártico. Em 06 de fevereiro de 1984, foi instalada a Estação Antártica "Comandante Ferraz" (EACF), na Baía do Almirantado, situado na Ilha Rei George (**Figura 5**) (Da Silva, 2012).



Figura 5 – Localização da estação de pesquisa antártica brasileira e outras estações de pesquisa internacionais na Ilha Rei George.

Fonte: Fonte: <http://cienciahoje.uol.com.br/galeria>

Macroalgas do Continente Antártico

Em especial para as regiões frias, como a Ártica e Antártida, as algas marinhas foram estudadas pela primeira vez na metade do século XIX. Os estudos iniciais foram realizados sobre a taxonomia e biogeografia das algas (Wulff *et al.*, 2009). Os mares Antárticos possuem 70% ou mais do seu fundo coberto por algas. YONESHIGUE-VALENTIN e colaboradores (2010) relatam que o continente Antártico possui cerca de 100 espécies, das quais cerca de 30% são endêmicas da Península Antártica, onde

destas, 44% são algas pardas, 36% são algas vermelhas e 18% são algas verdes. A maioria das algas são pertencentes à ordem das algas *Desmarestiales*. Dentre as espécies endêmicas ecologicamente importantes incluem-se as algas pardas *Himantothallus grandifolius*, *Desmarestia anceps*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Ascoseira mirabilis*, entre outras (Wiencke e Amsler, 2012).

O estudo sobre as algas marinhas bentônicas de ambientes polares tem aumentado nos últimos tempos, visto que desempenham um importante papel na cadeia alimentar produzindo, aproximadamente, 74000 toneladas de biomassa úmida, que serve de alimento para herbívoros, peixes e seres detritívoros além de servir de alimento em áreas de berçário para peixes, crustáceos e outros invertebrados (Valentin *et al.*, 2010; Godinho *et al.*, 2013). O grande interesse pelas macroalgas deve-se aos altos teores de lipídios e carboidratos presentes na biomassa, sendo superiores quando comparados a plantas terrestres (Barrera-Oro, 2002).

KUMARI e colaboradores (2012) relatam que a temperatura do ambiente é um fator impactante na composição de ácidos graxos encontrados nas algas. São evidenciados estudos que comprovam que os maiores teores de lipídios são encontrados nas algas em períodos de frio; no entanto, quando são expostas ao calor produzem altos teores de triacilgliceróis. As macroalgas antárticas apresentam um metabolismo diferenciado, quando comparado às demais macroalgas, com uma capacidade de adaptação em ambientes de frio extremo. Em razão disto, as macroalgas da Antártica têm se tornado foco de estudos em busca de novas moléculas (Graeve *et al.*, 2002).

Caracterização e Classificação das espécies *Adenocystis ultricularis*, *Ascoseira mirabilis*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia antarctic* e *Hymantothallus grandifolius*.

Macroalga *Adenocystis ultricularis* (Bory de Saint-Vincent)

Skottsberg

A macroalga *Adenocystis ultricularis* (**Figura 6**) apresenta talo simples com vesículas de 10 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro. Os talos têm estruturas haplostichous, apresentando como diferencial uma camada externa de pequenas células, com numerosos physodes e uma medula de filamentos soltos em torno grandes depósitos de mucilagem.



Figura 6 – Macroalga *Adenocystis ultricularis*

Fonte: Laboratório de Ficologia e Qualidade de Água Marinha, Universidade Estadual do Paraná, campus Paranaguá

Foto: Profª. Dra. Franciane Pellizzari

Classificação:

Filo:	<i>Ochrophyta</i>
Classe:	<i>Phaeophyceae</i>
Ordem:	<u><i>Ectocarpales</i></u>
Família:	<u><i>Adenocystaceae</i></u>
Gênero:	<u><i>Adenocystis</i></u>

Macroalga *Ascoseira mirabilis* (Skottsberg)

A macroalga *Ascoseira mirabilis* (**Figura7**) apresenta talos com 1,5 m de comprimento com garras discóide curtas e achatadas e folhagens em forma de cinta, inteira ou dividido perto da base em lâminas líguladas a 12 cm de largura.



Figura 7 – Macroalga *Ascoseira mirabilis*

Fonte: Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto Botânico de São Paulo

Foto: Profª. Dra. Mutue Toyota

Classificação: Filo: *Ochrophyta*
 Classe: *Phaeophyceae*
 Ordem: *Ascoseirales*
 Família: *Ascoseiraceae*
 Gênero: *Ascoseira*

Macroalga *Cystosphaera jacquinotii* (Montagne) Skottsberg

A macroalga *Cystosphaera jacquinotii* (**Figura 8**) apresenta talo de morfologia diversificada, desde rizóide sem apêndices até caulóide dicotomicamente simétrico. Possui pneumatócitos na porção inferior do talo na base dos filóides e órgãos reprodutores localizados na porção superior do talo também na base dos filóides. Os talos chegam a alguns metros de comprimento e ocorrem nas profundidades de 20-50 m. Essa espécie ocorre somente na porção central da Baía do Almirantado.



Figura 8 – Macroalga *Cystosphaera jacquinotii*

Fonte: Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto Botânico de São Paulo
 Foto: Profª. Dra. Mutue Toyota

Classificação: Filo: *Ochrophyta*
 Classe: *Phaeophyceae*
 Ordem: *Fucales*
 Família: *Seirococcaceae*
 Gênero: *Cystosphaera*

Macroalga *Desmarestia anceps* (J.V.Lamouroux)

A macroalga *Desmarestia anceps* (**Figura 9**) apresenta grandes talo em forma de pera e um esporófito com mais que 4m de comprimento, formando densas agregações no sublitoral. Comumente é encontrada em toda a Baía do Almirantado.



Figura 9 – Macroalga *Desmarestia anceps*

Fonte: Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto Botânico de São Paulo

Foto: Profª. Dra. Mutue Toyota

Classificação: **Filo:** *Heterokontophyta*
Classe: *Phaeophyceae*
Ordem: *Desmarestiales*
Família: *Desmarestiaceae*
Gênero: *Desmarestia*

Macroalga *Desmarestia antarctica* (R.L.Moe & P.C.Silva)

A macroalga *Desmarestia antarctica* (**Figura 10**) apresenta grandes talo em forma de pera e um esporófito com mais que 4m de comprimento, formando densas agregações no sublitoral. Comumente essa alga é encontrada em toda a Baía do Almirantado.



Figura 10 – Macroalga *Desmarestia antarctica*

Fonte: Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto Botânico de São Paulo
Foto: Prof^a. Dra. Mutue Toyota

Classificação: **Filo:** *Heterokontophyta*
Classe: *Phaeophyceae*
Ordem: *Desmarestiales*
Família: *Desmarestiaceae*
Gênero: *Desmarestia*

Macroalga *Hymantothallus grandifolius*, (A.Gepp & E.S.Gepp) Zinova

A macroalga *Himantothallus grandifolius* (**Figura 11**) apresenta talo em forma de banda e folha tipo filoide com bordas irregulares. Os talos se estreitam à medida que se aproximam da porção final, formando um curto e achatado caulóide, geralmente helicoidal. Os talos dessa espécie podem atingir 1 m de largura e 15-25 m de comprimento. *H. grandifolius* geralmente está aderida a rochas e pedras como um rizoide, sendo encontrada em profundidades de 10 a 100 m e é comum em toda a Baía do Almirantado.



Figura 11 – Macroalga *Himantothallus grandifolius*

Fonte: Núcleo de Pesquisa em Ficologia, Instituto Botânico de São Paulo

Foto: Profª. Dra. Mutue Toyota

Classificação:

Filo:	<i>Ochrophyta</i>
Classe:	<i>Phaeophyceae</i>
Ordem:	<i>Desmarestiales</i>
Família:	<i>Desmarestiaceae</i>
Gênero:	<i>Himantothallus</i>

Fitoesteróis

Os fitoesteróis são estruturalmente análogos ao colesterol que está presente em animais vertebrados. Esses compostos se diferenciam do colesterol por apresentarem substituintes metil ou etil na cadeia lateral do esterol na posição C-24, ou insaturação no C-22 (Grattan, 2013) (**Figura 12**). Também cabe ressaltar que a cadeia do colesterol é composta por oito átomos de carbono, enquanto a maioria dos fitoesteróis apresentam nove ou dez átomos de carbono (Lopes *et al.*, 2013).

O colesterol é o esterol mais abundante no reino animal; na sua forma livre está localizado na membrana plasmática dos animais e desempenha diversas funções essenciais para o organismo, tais como regular a fluidez da membrana, ser precursor de ácidos biliares, hormônios e da vitamina D (Ryan *et al.*, 2007). Por outro lado, as membranas de células vegetais contêm uma mistura de esteróis, com a finalidade de dar fluidez ou rigidez a membrana, regular sua permeabilidade, bem como age na transdução de sinais. Os fitoesteróis também participam das atividades enzimáticas ligadas à membrana e atuam na divisão celular (Roche *et al.*, 2010; Leong *et al.*, 2011).

No entanto, os esteróis presentes nos vegetais diferem-se em seus efeitos sobre a estabilidade nas membranas. Recentemente, tem-se reportado que o estigmasterol tem por característica causar alteração das membranas, devido a um aumento deste esterol, na membrana plasmática, em relação ao demais fitoesteróis, durante o período da senescência (Moreau *et al.*, 2002).

A mistura de esteróis de origem vegetal é composta, principalmente, por sitosterol, estigmasterol e 24 ξ -metilcolesterol, que é formado por uma mistura de isômeros (campesterol e 22-dihidrobrassicasterol) (Grattan, 2013).

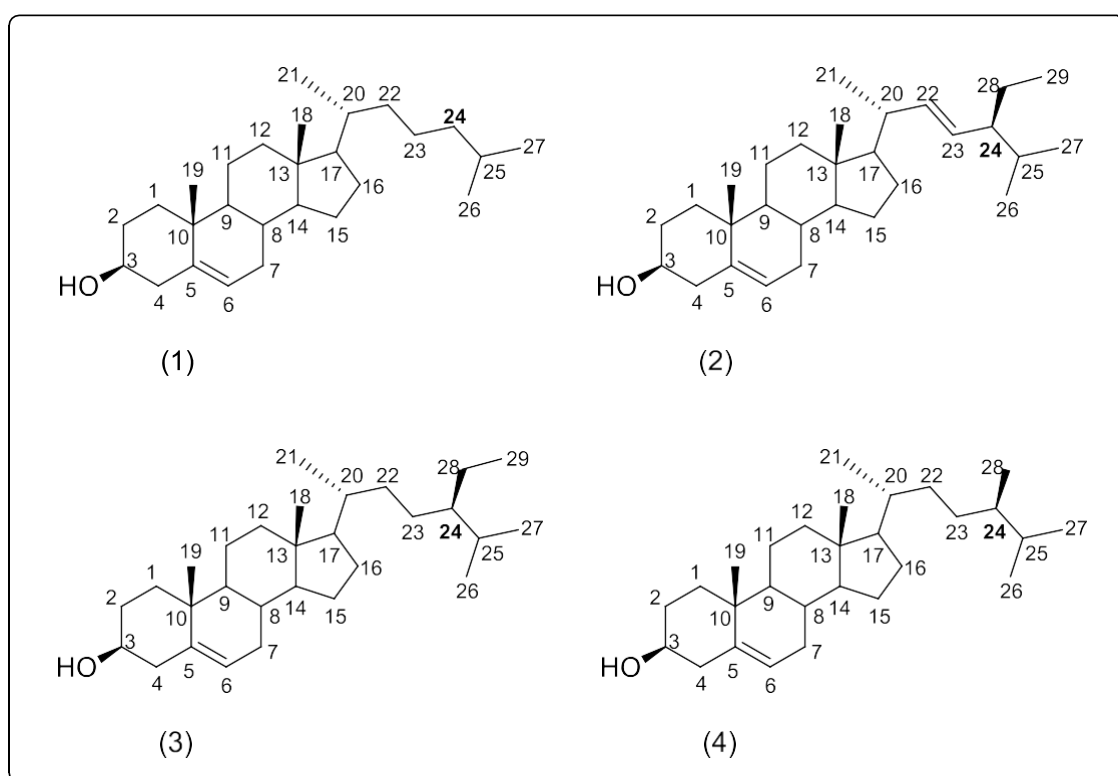


Figura 12 – Principais estruturas químicas dos esteróis, (1) colesterol, (2) estigmasterol, (3) sitosterol e (4) campesterol.

Os fitoesteróis são subdivididos de acordo com o número de grupos metila presentes em sua estrutura, que pode ser 4-monometil (uma metila), 4,4- dimetil (duas metilas) ou 4-desmetil (nenhuma metila) (Moreau *et al.*, 2002). Além disso, os esteróis 4-desmetil podem ser subdivididos em Δ 5-esteróis, Δ 7-esteróis e Δ 5,7-esteróis, dependendo da posição das ligações duplas no anel B (Kumari *et al.*, 2013).

Os fitoesteróis também são classificados quanto à presença ou ausência de ligações duplas, se subdividindo em esteróis, derivados dos esteroides que sofrem hidrogenação (estigmasterol, campesterol e β -sistosterol) e estanois (sistostanol e campestanol) (Tapiero *et al.*, 2003; Bradford e Awad, 2007; Brufau *et al.*, 2008).

Os esteroides são biossintetizados a partir da via do mevalonato (MVA) que está situada no citosol. Nesta via o 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) é reduzido a mevalonato (**Figura 13**) (Moreau *et al.*, 2002). No entanto a biossíntese destes compostos compartilha compostos da via metabólica dos isoprenoides, uma vez que o triterpenoide escualeno é um intermediário comum nas duas vias metabólicas (Lopes *et al.*, 2011). Mas nas algas os esteroides ainda podem ser biossintetizados pela via do 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato/1-deossi-D-xilulose-5-fosfato (MEP/DOXP) que está localizada nos plastídios (Lopes *et al.*, 2013). A escolha da via nas algas depende da sua história evolutiva, as cianobactérias utilizam a via MVA, as algas verdes contam com a via MEP/DOXP, enquanto algumas espécies como *Euglenophytes*, *Chlororachinophytes*, *Chrysophytes*, *Bacillariophytes*, *Pelagophytes* e *Haptophytes* utilizam ambas as vias, as quais encontram-se ativadas no citosol e plastídios (Kumari *et al.*, 2013). Os substituintes C-28 e C-29, são adicionados ao C-24 pela enzima metiltransferase, que controla os níveis de colesterol em organismos fotossintetizantes (Lopes *et al.*, 2011).

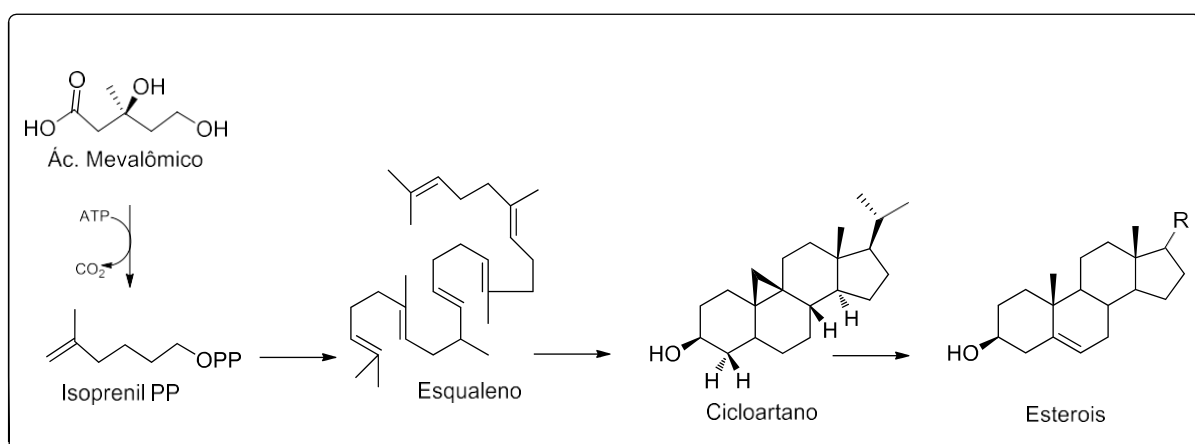


Figura 13 – Esquema geral da biossíntese de esteroides pela via MVA

Os esteroides são compostos de quatro anéis (A, B, C, D), um grupo hidroxila (OH) no C-3, dois grupos metila no C-18 e C-19 e uma cadeia lateral como demonstra a **Figura 14**. O domínio A é a única parte polar da molécula, a presença da hidroxila contribui para a interação de ligações de hidrogênio, enquanto C-4 e grupos metílicos do C-14 no domínio B afetam a conformação do anel A, resultando em uma molécula com forma planar. No domínio C a configuração R no C-20 determina a configuração da cadeia lateral e o domínio D define o comprimento da cadeia lateral e a estereoquímica do grupo alquila no C-24, que são essenciais para as interações intermoleculares (Kumari *et al.*, 2013). A literatura ressalta a grande diversidade de

esteróis; no entanto, os mais abundantes na natureza e os que estão disponíveis para a dieta humana são o β -sitosterol, campesterol e estigmasterol (Moreau *et al.*, 2002; Kumari *et al.*, 2013)

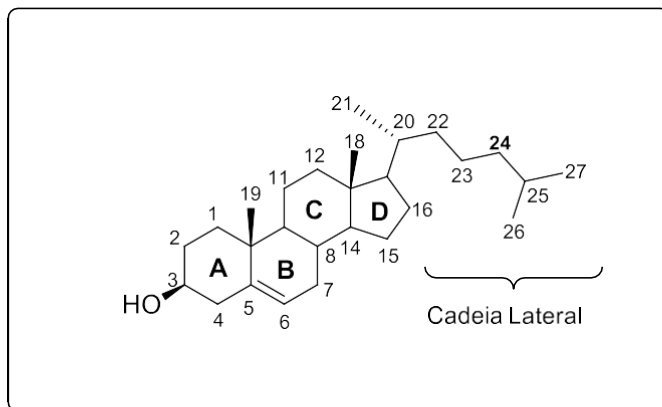


Figura 14 - Estrutura básica dos esteróis

Esteróis em Algas

Entre os organismos marinhos, as algas representam uma rica fonte de esteróis de origem vegetal, que podem ocorrer na sua forma livre, como ácidos graxos esterificados ou, em concentrações pequenas, envolvidos em conjugados glicosilados (Lopes *et al.*, 2011). Um grande número de esteróis tem sido isolado a partir de animais marinhos e geralmente diferem-se dos esteróis de origem vegetal em relação ao grau de insaturação no anel B e nas ligações presentes na cadeia lateral (**Figura 14**) (Bhakuni e Rawat, 2005). A presença de esteróis em algas foi estabelecido pela primeira vez por HEILBRON *et al.* (1935). Estas substâncias são componentes importantes da membrana celular e responsáveis por várias funções celulares (Grattan, 2013). A composição de esteróis presente nas macroalgas é bem diversificada (Giner *et al.*, 2008). Nas algas vermelhas são encontrados, principalmente, colesterol e 24-metilenocolesterol (El Hattab *et al.*, 2006). As algas pardas possuem o estero 24-metilenocolesterol, que passa pelo processo de metilação através da enzima metiltransferase levando a formação de grande quantidade de fucosterol e do seu isômero isofucosterol (Lopes *et al.*, 2013). As algas verdes apresentam insaturação no C-22 que é reduzido levando a um acúmulo de sitosterol (Bouzidi *et al.*, 2008). Em geral, os esteróis que apresentam C-29 estão, principalmente, nas macroalgas *Phaeophyta* e *Chlorophyta*. As algas *Chlorophytas* são desprovidas da via do MVA e utilizam, exclusivamente, o MEP/DOXP para a formação de esteróis (Lopes *et al.*, 2011).

A maioria dos estudos disponíveis demonstram que os alimentos enriquecidos com esteróis atuam, principalmente, no lúmen intestinal, competindo com o colesterol do organismo (Kumari *et al.*, 2011; Lopes *et al.*, 2011; Liu e Ruan, 2013; Dos Santos *et al.*, 2014). Além da redução dos níveis de colesterol, os esteróis de algas demonstraram resultados promissores atuando como antipirético, antidiabético, ação anti-inflamatória, anti-hipertensivos, antioxidante, anti-aterosclerótico e anticarcinogênico (Lee *et al.*, 2003; Lagarda *et al.*, 2006; Mackay e Jones, 2012; Kumari *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013). BASKAR e colaboradores (2013) demonstraram resultados promissores empregando esteróis no tratamento de câncer do cólon realizados em modelo animal. Em um estudo de caso-controle foi observado uma redução de 50% no risco de câncer de pulmão (De Stefani *et al.*, 2000). Dados epidemiológicos sugerem uma correlação entre a ingestão de esteróis vegetais, e uma redução no risco de câncer. Estimou-se que a ingestão de fitoesteróis pode estar relacionado com uma redução de 20% no risco de câncer. Assim, o consumo de algas ou de produtos derivados torna-se uma alternativa para o consumo desses compostos bioativos com aplicações nutraceuticas (Menéndez-Carreño *et al.*, 2012).

Métodos de Extração de Esteróis de Algas

Um processo extrativo de alta qualidade garante uma melhor detecção, identificação e quantificação dos esteróis vegetais. Os esteróis, assim como os ácidos graxos, são tradicionalmente extraídos a partir de algas, por meio de métodos de extração que utilizam solventes orgânicos, como clorofórmio, metanol, diclorometano, éter etílico, éter de petróleo e hexano, ou uma combinação de dois ou mais destes solventes (Mercer e Armenta, 2011; Kumari *et al.*, 2013).

DE BOER e colaboradores (2012) demonstraram métodos de extração a partir de biomassa algal úmida e seca; no entanto, para um maior rendimento do extrato lipídico de algas empregando solventes orgânicos, é necessária uma baixa umidade na biomassa. Um estudo realizado por DOS SANTOS e colaboradores (2013), demonstrou que o modo de secagem da biomassa interfere diretamente na extração dos esteróis. Esse estudo revelou que o processo de liofilização conduziu a rendimentos maiores quando comparado com a secagem em estufa de circulação de ar quente. A extração por solventes orgânicos remove os esteróis e todo o material lipídico das células algais, por meio de difusão; enquanto que a secagem da amostra por liofilização ocasiona uma alteração na parede celular durante o congelamento,

aumentando a permeabilidade da célula e tornando, assim, o método extrativo mais eficiente (Ranjan *et al.*, 2010).

A maioria das algas são protegidas por uma parede celular espessa, que limita o contato dos lipídios com o solvente; deste modo, várias técnicas para o rompimento celular das algas foram propostas, incluindo prensagem, solvente a quente, sonicação via ultrassom, micro-ondas, choque osmótico e por fluido supercrítico (Mercer e Armenta, 2011; De Boer *et al.*, 2012; Dos Santos *et al.*, 2014).

A eficiência dos diferentes métodos de extração de lipídios depende da solubilidade das suas classes de lipídios com os constituintes dos solventes empregados e também da natureza da matriz da amostra, pois ambos podem influenciar no grau de extração. O solvente da extração ou a mistura de solventes deve ser apolar (insolúvel em água), a fim de remover os lipídios da célula, no entanto, um solvente com alta polaridade poderá dificultar a solubilização dos triacilgliceróis e outros lipídios não polares. Portanto a escolha do melhor solvente deve levar em conta estes dois aspectos (Mercer e Armenta, 2011)

O método BLIGH e DYER (1959), é um método consolidado muito utilizado para extração de lipídios de algas. Os autores utilizaram uma mistura de solventes (metanol e clorofórmio), de forma que essa mistura tenha uma alta eficiência extrativa. O clorofórmio dissolve os lipídios neutros (triglicerídeos), enquanto o metanol dissolve a parte polar da membrana lipídica. FRANCAVILLA e colaboradores (2010) adaptaram esta metodologia para a extração de esteroides de plantas. Os autores isolaram e identificaram uma variedade de esteróis de duas espécies de microalgas. Neste estudo foi constatado que o conteúdo total de esteróis presentes nestas algas foi próximo de 1% da biomassa seca.

FRANCAVILLA e colaboradores (2010) propuseram uma metodologia de esteróis baseada na extração da porção lipídica e posterior saponificação. Diferentemente, LOPES e colaboradores (2011) realizaram um estudo com 18 espécies de macroalgas típicas da região da costa de Portugal, dos filos *Rhodophyta*, *Phaeophyta* e *Chlorophyta*, propondo uma metodologia em único passo, compreendendo a extração e a separação dos esteróis. Os autores conseguiram identificar e quantificar sete esteróis (desmosterol, ergosterol, fucosterol, colesterol, campesterol, estigmasterol e β -sitosterol). Também relatam que as algas do filo

Phaenophyta apresentaram o maior teor de esterol e o fucosterol é o esterol predominante. No estudo proposto foi constatado que as diferenças taxonômicas entre as espécies, origens geográficas, salinidade, temperatura e o estágio de desenvolvimento em que a alga se apresenta contribuíram para os diferentes perfis de esteróis.

A extração de lipídios é, tipicamente, realizada por refluxo com altas temperaturas e por tempos prolongados (até 6 horas), podendo levar à formação de subprodutos de coloração variada (Hobuss *et al.*, 2012). XIAO e colaboradores (2013) demonstraram um novo método, enfocando a redução no tempo de extração de esteróis de plantas, com uma extração assistida por micro-ondas. O melhor rendimento foi obtido em 20 min de extração, considerado significativamente reduzido quando comparado com os métodos convencionais (Francavilla *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2013).

Estudos têm demonstrado os efeitos favoráveis da irradiação ultrassônica através da sonda para a extração de lipídios de algas, por ela ser altamente reprodutível, econômica, eficiente, diminuir significativamente o tempo de reação e a quantidade de solvente. Outro aspecto positivo é que a reação pode ser realizada à temperatura ambiente (Adam *et al.*, 2012; Hobuss *et al.*, 2012). Devido ao processo de cavitação que o ultrassom proporciona, ocorre o rompimento das paredes celulares, aumentando a eficiência extrativa (Araujo *et al.*, 2013).

ADAM e colaboradores (2012) enfatizam a importância do ultrassom na extração de lipídios de algas com a biomassa úmida, sendo desnecessário o uso de solventes orgânicos e fazendo com que o processo extrativo seja mais “verde”. Os rendimentos obtidos pelos autores são memores, no entanto há um menor consumo de solvente orgânico, tornando o processo ambientalmente viável.

Métodos de Análise de Esteróis

De forma geral, a quantificação de esteróis é importante, no ponto de vista de composição química da matriz a ser estudada. No ambiente marinho, as algas são parte da base da cadeia alimentar. Em outras situações elas são objetos de pesquisa, quando são analisadas como fonte de alimentos e na avaliação de dietas (Slavin e Yu, 2012). Os esteróis de plantas são extraídos juntamente com os extratos lipídicos utilizando preferencialmente solventes, tais como etanol, metanol, clorofórmio e

hexano. Os extratos são saponificados com solução etanólica ou metanólica de KOH (Kumari *et al.*, 2011). Posteriormente, estes são caracterizados por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama (GC/FID), Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrômetro de Massas (GC-MS), Cromatografia Líquida Acoplada a Espectrômetro de Massas (LC-MS/MS), Espectroscopia de Infravermelho (FTIR), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) ou Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (El Hattab *et al.*, 2006; Francavilla *et al.*, 2010; Lopes *et al.*, 2011; Menéndez-Carreño *et al.*, 2012; Liu e Ruan, 2013; Mo *et al.*, 2013; Dos Santos *et al.*, 2014).

As análises de esteróis têm sido usualmente realizadas por Cromatografia Gasosa com Detecção de Ionização de Chama (CG/FID) ou por Espectrômetro de Massa (CG-MS), devido seu poder de identificar e quantificar uma gama de estruturas de esteróis (Lopes *et al.*, 2011). Porém a Cromatografia Gasosa (CG) apresenta algumas desvantagens, como o processos de purificação de compostos ou derivatizações dos mesmos, geralmente com trimetilsililéteres (TMS) ou derivados de acetato, antes da análise, para aumentar a volatilidade dos compostos (Bedner *et al.*, 2008). A Cromatografia Líquida (HPLC) tem se destacado para as análises de esteróis por evitar a etapa de derivação, minimizando assim as perdas da amostra (Mendiara *et al.*, 2015)

Estudos recentes relacionados com a separação de esteróis por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC), com detector de luz ultravioleta (UV-HPLC), detector de fluorescência (FL-HPLC), acoplada à detecção de matriz (HPLC-DAD) ou conjunto de detecção por espectrometria de massa (HPLC-MS/MS) têm demonstrado resultados mais efetivos nas análises de matrizes complexas como os esteroides, no entanto ele também tem suas limitações, como as coeluições (Slavin e Yu, 2012; Lopes *et al.*, 2013). ABRIL (2001) relatou a dificuldade na separação dos três fitoesteróis derivados da soja (campesterol, estigmasterol e β -sitosterol). Um método desenvolvido INDYK (1990), utilizando uma coluna C-18 Rad-PAK, otimizou a separação dos esteróis, entretanto o mesmo ainda mostrou algumas dificuldades na separação do campesterol e estigmasterol. SLAVIN e colaboradores (2012) testaram vários tipos de colunas (C8, C18, C30 e fenil) em HPLC com detectores SPD-20A UV / Vis. e detector ELSD -LT II, com o intuito de verificar o melhor resultado na identificação e quantificação dos fitoesteróis. A coluna de fenil XTerra® 150 mm 3.9 mm 3.5 μ m da Waters possibilitou a separação dos esteróis por completo.

Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), combinada com o uso de a luz ultravioleta (UV / Vis) (em um comprimento de onda de 205 nm), são comumente usadas na detecção de esteroides. No entanto o HPLC, quando acoplado espectrometria de massa com Ionização Química a Pressão Atmosférica (APCI-MS), se torna eficiente para a detecção dos esteroides (Abidi, 2001).

PARTE III

4 Artigo Científico

Artigo 1

Ultrasound-assisted extraction of steroids at room temperature from Antarctica Macroalgae *Desmarestia anceps* and characterization by Gas Chromatograph

Camila F. P. Nunes^a, André V. Bairros^a, Daiane Dias^b, Pio Colepicolo Neto^c,
Ernani Pinto^c and Claudio M. P. Pereira^{a*}

^aCentro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Laboratory of Lipidomic e Bioorganic (LLipidomicaBio) 96010-900, Campus Capão do Leão, RS, Brazil.

^bEscola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

^cInstituto de Química, Universidade Federal de São Paulo, 05508-900 Cidade Universitária São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author at: Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira, Center for Chemical Sciences, Pharmaceutical and Food, Federal University of Pelotas – UFPel, Campus Capão do Leão – Post office box 354 – CEP 96010-900 – Pelotas – RS – Brazil

E-mail: claudiochemistry@gmail.com

Abstract

This paper proposes an efficient technique in the extraction of sterols from the Antarctica macroalgae *Desmarestia anceps* using ultrasound at room temperature. For comparison, magnetic stirring and microwave irradiation extractions techniques were used. The extracts of the sterols obtained were characterized by gas chromatography with flame ionization detection (GC/FID) and gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS), making the identification and quantification of seven sterols (cholesterol, brassicasterol, ergosterol, campesterol, stigmasterol, fucosterol and β -sitosterol) in this macroalgae possible. The ultrasound extraction was more efficient than the comparative techniques, and higher extraction recovery rates were obtained when extraction an time 20 minutes and an amplitude of 40% were used in.

Keywords: Marine brown algae. Antarctic regions. Ultrasound. Sterols.

1 Introduction

Algae are a group of heterogeneous organisms that are commonly divided based on size and pigmentatio (Leal et al., 2013). The classified three main algal divisions are phaeophyceae (brown algae), chlorophyceae (green algae) and rhodophyceae (red algae) (Bouzidi et al., 2008). The Antarctica region possesses about 100 species of macroalgae, of which about 30% are endemic to the Antarctic Peninsula, where 44% are brown algae, 36% are red and 18% are green (Valentin et al., 2010). The brown algae belonging to the Desmarestiales algae order (Wiencke et al., 2012), are found in the seas of cold temperate and polar regions (Godinho et al., 2013), these being the most abundant in the Antarctic continent (Wiencke et al., 2012).

Studies report that marine benthic algae in polar environments have a higher amount of lipids compared with terrestrial plants (Godinho et al., 2013; Barrera-Oro, 2002). In the lipid fraction, the presence of sterols occurs naturally in the algae and are defined as sterols (Leong et al., 2011). Sterols are structurally similar to cholesterol molecules, differing by the presence of the substituents in the side chain of the sterol at the C-24 position (Grattan, 2013). The composition of sterols present in macroalgae is diversified (Giner et al., 2008). In the red algae, cholesterol and 24-methylene-cholesterol are mainly found (Bouzidi et al., 2008). The brown algae have the 24-methylene-cholesterol sterol that passes through the methylation process by the enzyme methyltransferase leading to the formation of large amounts of fucosterol and 28-isofucosterol (Bouzidi et al., 2008; El Hattab et al., 2006). Green algae have unsaturation at C-22 that is reduced leading to an accumulation of sitostero (Kapetanovic et al., 2005).

Sterols derived from natural products are extremely important for human consumption, since they present a wide range of beneficial health effects (Lagarda et al., 2006). Fucosterol in particular has antioxidant activity (Lee et al., 2003) while ergosterol shows high anti-inflammatory and anti-carcinogenic potential (Ma et al., 2013). A study by LOUW et al. (2002) shows that the β -sitosterol acts against rheumatoid arthritis . In general, sterols have promising results in the reduction of blood cholesterol levels in the human body and in the prevention of cardiovascular diseases.

Various methods have been proposed for extracting these bioactive compounds traditionally extracted by magnetic stirring or soxhlet extraction (Kumari et al., 2011; Mercer et al., 2011). However, due to a thick algae cell wall limiting contact of the solvent with the lipid, several techniques have been proposed for the disruption of the cell membrane of the algae to extract lipids including pressing, hot solvent, sonication by ultrasound and microwaves (Mercer et al., 2011; Dos Santos et al., 2014).

Studies have shown the beneficial effects of the ultrasound for the extraction of fatty acids from algae because this method is reproducible, economical, efficient and able to significantly decrease the extraction time (Hobuss et al., 2012). The use of ultrasound for the sterols extraction in plants in general has proven to be a very simple and effective method compared to the other conventional methods described in literature (Orozco-Solano et al 2010). Recent studies have reported the advantages of ultrasound such as fast reactions, processes at room temperature and high yields of isolated products in organic reactions (Deshmane et al., 2009; Pacheco 2014; Orozco-Solano et al 2010). Recently, our research group showed the successful conversion of fatty acid esters (Kumari et al., 2011) as well as the ultrasound-promoted biodiesel synthesis of microalgae (Hobuss et al., 2011). In addition, ultrasound has proven effective in the extraction of sterols in other plants (Schinor et al., 2004). However, there is still no report in literature on the use of ultrasound for the extraction of macroalgal sterols in cold regions where the cell wall is very thick, making it difficult to extract. Thus, this study aims to compare the extraction efficiency of ultrasound against known methods (magnetic stirring and microwave) already described in the literature, for the extraction of sterols from *Desmarestia anceps*, an Antarctic brown macroalgae.

2 Materials and Methods

Reagents

Standards of cholesterol (99%), brassicasterol (87%), ergosterol (95%), campesterol (65%), stigmasterol (95%), fucosterol (93%) and β -sitosterol (95%) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and prepared with HPLC grade methanol (Darmstadt, Germany). HPLC grade acetonitrile, n-hexane and ethanol were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride, potassium hydroxide

and anhydrous sodium sulfate were obtained from Panreac (Castellar del Valle`s, Spain).

Sample

The sample of *Desmarestia anceps* macroalgae was collected in the Punta Plaza region on King George Island. Coordinates: 62°5'8.54 "x 58°25'10.64" on 13/01/2012.

Extractions of Sterols

The macroalgae was lyophilized (LÍOTOP, Brazil) for 24 hours and ground in an analytical mill balls (Q298A, Quimis, Brazil), sterol extractions were carried out later on.

The three methodologies described below were carried out with the addition of 50 μL of a mixed solution of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ cholesterol, brassicasterol, ergosterol, campesterol, stigmasterol, fucosterol and β -sitosterol. After completion of each extraction, the organic phase was collected and the extract was dried over anhydrous sodium sulfate. solvent Evaporation was carried out in a rotary vacuum evaporator and the sample was then resuspended in acetonitrile (200 μL) for chromatographic analysis.

Extraction of Sterols by Magnetic Stirring

The sterols were extracted following the methodology of Lopes et al., 2011. The biomass (1 g) was subjected to stirring and reflux for 1h at 70 °C in 40 ml of 10% KOH ethanolic solution. The sample was allowed to stand at room temperature, the mixture was then centrifuged for 3 min at 5000 rpm. Subsequently, the unsaponifiable fraction was extracted with n-hexane (3 x 10 mL).

Ultrasound Irradiation Extraction of Sterols

Since no method for sterol extraction of cold region macroalgae that uses ultrasound is known to us, the method described by Lopes et al. 2011 was used with some modifications. In a 100 mL erlenmeyer flask, 1 g of biomass with 40 ml of ethanolic solution of 10% KOH was added and the mixture was sonicated with

ultrasound at different times and amplitudes at room temperature (24 °C). The sample was extracted with 20 mL of saturated NaCl solution to accelerate the process of separating the organic phase from the aqueous phase and providing a more efficient extraction process (Saïen et al., 2010) and n-hexane (3 x 10 mL). The organic phase was collected and dried with anhydrous sodium sulfate to remove excess water from the extract while the solvent was evaporated under vacuum. Amplitudes of 20, 30 and 40% and extraction times of 5, 10, 20 and 30 minutes were evaluated.

Microwave Extraction of Sterols

The sterols were extracted following the methodology of Xiao et al., 2013. In a 100 mL flask, 1 g of biomass was added with 20 mL ethanol solution of 1.5 mol L⁻¹ KOH and the mixture was subjected to microwave irradiation for 30 min with a power of 300W and a temperature of 70 °C. After the irradiation time the sample was centrifuged for 5 minutes (3500 rpm) and extracted with n-hexane (3 x 10 mL). The organic phase was collected and dried with anhydrous sodium sulfate and the solvent was evaporated under vacuum.

Determination of sterols by gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID)

Quantitative analysis of brassicasterol, campesterol, cholesterol, ergosterol, and stigmasterol were performed on a GC/FID model 2010 (Shimadzu®, Japan) using a fused silica capillary column Elite-5 (30m x 0.25mm i.d. x 0,25µm, Perkin Elmer®) and hydrogen as carrier gas at a flow rate of 2.04 mL min⁻¹ (Dos Santos et al., 2014). Manual injection of 2 µL in programmed temperature vaporizer (PTV) in direct mode. The injector and detector temperatures were 250 °C and 320 °C respectively. The temperature schedule was: initial temperature of 150 °C (kept for 1 min), and increased by 10 °C min⁻¹ until 320 °C, this condition was kept for 4 min. The total analysis time was 22 minutes .

Determination of sterols by gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC/MS)

The β -sitosterol and the fucosterol were analyzed in a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer, model GC/MS QP-2010SE (Shimadzu ®, Japan)

equipped with an autosampler AOC-20i (Dos Santos et al., 2014). One fused silica capillary column RTX-5MS (30m x 0.25mm x 0,25 μ m, Restek®) was used, and the chromatographic conditions were: initial temperature of 150 °C for 1 min increasing by 10 °C min⁻¹ until 320 °C and this temperature was kept for 4 minutes. The injected volume was 2 μ L in splitless mode; injector temperature: 250 °C; carrier gas: helium; linear flow of gas: 1.11 mL min⁻¹, with selective ion monitoring analysis mode (SIM).

3 Results and Discussion

Chromatographic determination of sterols

The analyses of the standard solutions of brassicasterol, campesterol, cholesterol, ergosterol, stigmasterol, fucosterol and β -sitosterol were first carried out by GC-FID (**Figure 1**). As it can be seen, there was a co-elution between fucosterol and β -sitosterol (peak 6, **Figure 1a**). In the chromatogram obtained from *D. Anceps* macroalgal extract (**Figure 1b**), it can be observed that fucosterol and β -sitosterol are the most abundant compounds. Since the aim is to quantify each of the sterols listed above, and taking into account the abundance of compounds that coeluted (allowing the sample dilution), the quantification of fucosterol and β -sitosterol were performed by GC/MS and those of brassicasterol, campesterol, cholesterol, ergosterol, and stigmasterol were performed by GC-FID.

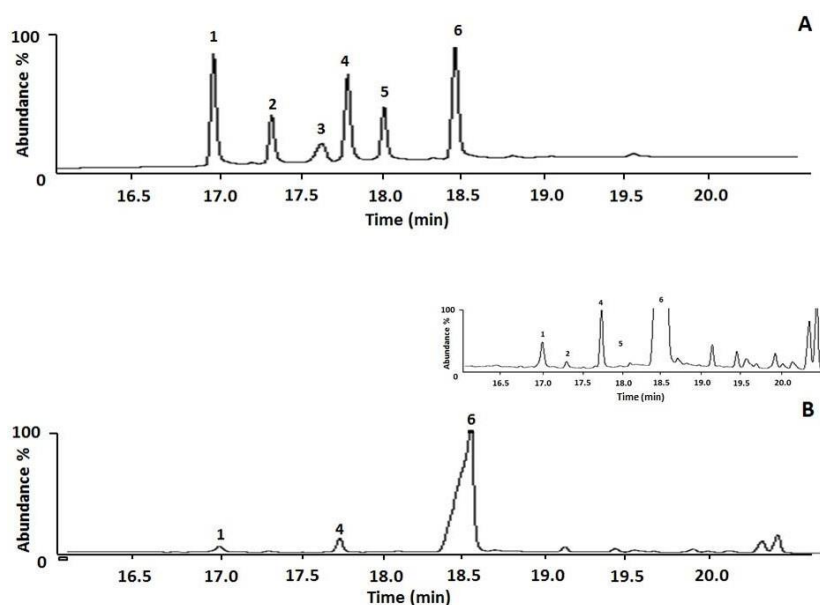


Figure 1 - Chromatograms of sterols determined by GC/FID (A) standard solutions of 100 μ g mL⁻¹ of cholesterol (1) brassicasterol (2), ergosterol (3) campesterol (4) stigmasterol (5) and co-elution of

fucosterol and β -sitosterol (6). (B) Chromatogram of the algae *Desmarestia anceps*. (1) cholesterol, (4) campesterol and (6) a mixture of β -sitosterol and fucosterol.

Once the chromatographic conditions were defined, the extracts obtained from the comparative extraction methods were analyzed by GC/MS and GC/FID.

Comparison of Extraction Methods

For the sterol extraction, three extraction methods described in Section 2.3 were applied (n=3). Table 1 shows the recoveries obtained for the extraction of sterols determined by GC/FID and GC-MS.

Table 1: Sterol extraction recovery values by magnetic stirring, ultrasound and microwave.

Sterols	Extraction recovery (%)		
	Magnetic stirring	Ultrasound*	Microwave
Cholesterol	13 $\pm$ 4.3	100 $\pm$ 2.8	25 $\pm$ 3.5
Brassicasterol	1 $\pm$ 2.8	2 $\pm$ 1.7	3 $\pm$ 0.3
Ergosterol	46 $\pm$ 4.3	38 $\pm$ 6.5	25 $\pm$ 1.9
Campesterol	32 $\pm$ 6	101 $\pm$ 9.2	13 $\pm$ 7.0
Stigmasterol	60 $\pm$ 8.1	119 $\pm$ 2.7	35 $\pm$ 8.6
Fucosterol	7 $\pm$ 5.6	14 $\pm$ 0.9	40 $\pm$ 6.5
β -sitosterol	1 $\pm$ 0.4	12 $\pm$ 0.9	2 $\pm$ 0.1

* Amplitude: 30% and time extraction: 30 min

As it can be seen in **Table 1**, the highest recovery levels for 4 (cholesterol, campesterol, β -sitosterol and stigmasterol) of the 7 compounds were obtained using the ultrasound. According to Araújo et. al. 2013 ultrasound irradiation promotes the disruption of the cell walls of algae through the cavitation process which will result in a higher extraction efficiency. Therefore, the distinction of the results between the extraction methods employed was possible due to the effectiveness with which cavitation acts on the cell wall of the *Desmarestia anceps* algae and how it was broken (De Boer et al 2012).

For most of the compounds studied, with the use of microwaves, lower levels of recovery were obtained. According to Xiao et al., 2013, the extraction yield is reduced when the microwave is used, because at high potencies the degradation of the sterols present in the sample can occur. In addition, the extraction was carried out at 70 °C,

which can also degrade the compounds causing the formation of oxysterols Barriuso et al 2012).

With the magnetic stirring method, lower recovery levels were obtained compared to the ultrasound for 5 (cholesterol, brassicasterol, campesterol, stigmasterol and β -sitosterol) of the 7 compounds. This method uses high temperatures and therefore like the microwave extraction process may lead to oxidation of sterols (De Boer et al., 2012), lowering the extraction yield of sterols, as well as requiring higher extraction time (1h). In addition, the cell walls of the Antarctica macroalgae exhibit greater physical strength since they are found in low temperatures sites (Graeve et al., 2002). Taking into consideration that there is no cell wall disruption with magnetic stirring and the high polarity of the saponified solution in this procedure, this sterols extraction is not efficient in this kind of sample.

Since the ultrasound showed higher recovery levels for most of the compounds studied, it was necessary to optimize this method by varying parameters such as extraction time and amplitude in order to obtain a fast, economical method with greater extraction efficiency. The results for the variation of these parameters are demonstrated in Figures 2 a and b.

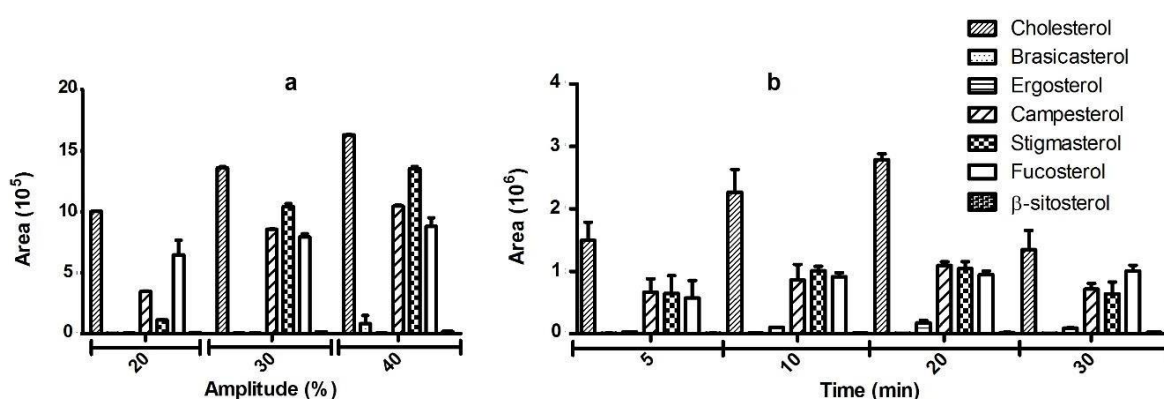


Figure 2 - Results obtained by gas chromatography of the parameters tested for the ultrasound method: (a) variation in amplitude 20, 30 and 40%, (b) variation in extraction time 5, 10, 20 and 30 min. (n=3, standart desviation less than 10)

Firstly, the sterols extraction time of 30 min was set and the amplitude was varied in 20, 30 and 40% (**Figure 2a**). As it can be seen in Figure 2a, the extraction efficiency improves with increasing amplitude. Thus, 40% was chosen as the ideal amplitude for extraction. The extraction time was then varied at 5, 10, 20 and 30 min (**Figure 2b**). For simultaneous extraction of the compounds of interest, the time of 20

minutes promoted the extraction of the most abundant compounds. Additionally, room temperature of extraction (24 °C) together with the protocol developed also preserve the sterol structures enabling the characterization of molecules of significant value in biochemistry. In the future, ultrasound may also be applied as a promoter means in the extraction of sterols from other natural sources.

4 Conclusion

Through this study it can be concluded that the methodology developed for the ultrasound extraction of macroalgae sterols from Antarctica *Desmarestia anceps* was highly feasible since the technique showed significant advantages such as simplicity of implementation, extraction time reduction besides that it can be performed at room temperature. It is worth noting that the ultrasound extraction makes a protocol that preserves the integrity of the structures of sterols, which are important compounds from the biochemical point of view. In the future, ultrasound may also be applied as a promoter means in the extraction of sterols from other natural sources.

5 Acknowledgement

The authors are grateful to CNPq, FAPERGS and CAPES for financial and fellowship support.

6 References

- ARAUJO, G.; MATOS, L.; FERNANDES, J.; CARTAXO, S.; GONCALVES, L.; FERNANDES, F.; FARIAS, W.; Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method, **Ultrasonics sonochemistry**, v.20, p.95-98, 2013.
- BARRERA-ORO, E. The role of fish in the Antarctic marine food web: differences between inshore and offshore waters in the southern Scotia Arc and west Antarctic Peninsula. **Antarctic Science**, v. 14, n. 04, p. 293-309, 2002.
- LEONG, W.; Che M.; Yaakob B.; Tan, C.; Leong, W.; Lai, O.; Long, K.; Misran, M. Preparation and characterisation of water-soluble phytosterol nanodispersions. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 77-83, 2011.
- BARRIUSO, B.; OTAEGUI-ARRAZOLA, A.; MENÉNDEZ-CARREÑO, M.; ASTIASARÁN, I.; ANSORENA, D. Sterols heating: Degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products, **Food chemistry**, v.135, p.706-712, 2012.
- BOER, K.; MOHEIMANI, N.; BOROWITZKA, M.; BAHRI, P. Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: a review focused on energy consumption, **Journal of Applied Phycology**, v.24, p.1681-1698, 2012.

BOUZIDI, N., DAGHBOUCHE, Y., EL HATTAB, M., ALICHE, Z., CULIOLI, G., PIOVETTI, L., GARRIGUES, S., DE LA GUARDIA, M. Determination of total sterols in brown algae by Fourier transform infrared spectroscopy. **Analytica chimica acta**, v.616, p.185-189, 2008.

DESHMANE, V.; GOGATE, P.; PANDIT, A.; Ultrasound assisted synthesis of isopropyl esters from palm fatty acid distillate, **Ultrasonics sonochemistry**, v.16, p.345-350, 2009.

DOS SANTOS, M. A. et al. Profile of Bioactive Compounds in Avocado Pulp Oil: Influence of the Drying Processes and Extraction Methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 1, p. 19-27, 2014.

EL HATTAB, N., DAGHBOUCHE, Y., HATTAB, M. E., PIOVETTI, L., GARRIGUES, S., GUARDIA, M. D. L., FTIR-determination of sterols from the red alga *Asparagopsis armata*: Comparative studies with HPLC. **Talanta**, v.68, p.1230-1235, 2006.

GINER, J.-L.; ZHAO, H.; TOMAS, C. Sterols and fatty acids of three harmful algae previously assigned as *Chattonella*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2167-2171, 2008.

GODINHO, V. M., FURBINO, L. E., SANTIAGO, I. F., PELLIZZARI, F. M., YOKOYA, N. S., PUPO, D., ALVES, T. M., JUNIOR, P. A., ROMANHA, A. J., ZANI, C. L. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **The ISME journal** 7, p.1434-1451, 2013.

GRAEVE, M.; KATTNER, G.; WIENCKE, C.; KARSTEN, U. Fatty acid composition of Arctic and Antarctic macroalgae: indicators for phylogenetic and trophic relationships, **Marine ecology-progress series**, v.231, p.67-74, 2002.

GRATTAN, B. J. Plant sterols as anticancer nutrients: evidence for their role in breast cancer. **Nutrients**, v.5, p.359-387, 2013.

HOBUSS, C.; ROSALES, P.; VENZKE, D.; SOUZA, P.; GOBBI, P.; GOUVEA, L.; SANTOS, M.; PINTO, E.; JACOB-LOPES, E.; PEREIRA, C. Cultivation of algae in photobioreactor and obtention of biodiesel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p. 361-364, 2011.

HOBUSS, C.; Venzke, D.; Pacheco, B.; Souza, A.; Santos, M.; Quina, F.; Fiametti, K.; Oliveira, J.; Pereira, Cmp Ultrasound-assisted synthesis of aliphatic acid esters at room temperature. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 387-389, 2012.

KAPETANOVIĆ, R., SLADIĆ, D. M., POPOV, S., ZLATOVIĆ, M. V., KLJAJIĆ, Z., GAŠIĆ, M. J. Sterol composition of the Adriatic Sea algae *Ulva lactuca*, *Codium dichotomum*, *Cystoseira adriatica* and *Fucus virsoides*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.70, p.1395-1400, 2005.

KUMARI, P.; REDDY, C.; JHA, B. Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. **Analytical Biochemistry**, v. 415, n. 2, p. 134-144, 2011

LAGARDA, M., GARCIA-LLATAS, G., FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.41, p.1486-1496, 2006.

LEAL, M.; Calado, R.; Munro, M.; Blunt, J.; Puga, J.; Jesus, B.; Rosa, R.; Madeira, C. Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 11, p. 1380-1390, 2013.

LEE, S., LEE, Y. S., JUNG, S. H., KANG, S. S., SHIN, K. H. Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliculosus*. **Archives of pharmacal research**, v. 26, p.719-722, 2003.

LOPES, SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. Sterols in Algae and Health. In: Hernández-Ledesma, B.; Herrero, M. **Bioactive Compounds from Marine Foods Plant and Animal Sources**, p.173-187, 2013.

LOUW, I., HALLAND, A., BOUIC, P., FREESTONE, M., Lamprecht, J. A pilot study of the clinical effects of a mixture of beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside in active rheumatoid arthritis (RA). **American Journal Of Clinical Nutrition**, v.75, n.2, p.351S-351S, 2002.

MA, L., CHEN, H., DONG, P., LU, X. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. **Food chemistry**, v.139, p.503-508, 2013.

MERCER, P.; ARMENTA, R. E. Developments in oil extraction from microalgae. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 5, p. 539-547, 2011.

OROZCO-SOLANO, M.; RUIZ-JIMÉNEZ, J.; LUQUE DE CASTRO, M. Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 8, p. 1227-1235, 2010.

PACHECO, B., NUNES, C.; ROCKEMBACH, C.; BERTELLI, P.; MESKO, M. ROESCH-ELY, M.;MOURA, S.; PEREIRA, C.; Eco-friendly synthesis of esters under ultrasound with p-toluenesulfonic acid as catalyst, **Green Chemistry Letters and Reviews**, v.7, p.265-270, 2014.

SAIEN, J.; ASADABADI, S. Salting-out effect of NaCl on the rate of mass transfer of liquid–liquid extraction in a two impinging-jets contacting device. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 41, n. 3, p. 295-301, 2010.

SCHINOR, E.; SALVADOR, M.; TURATTI, I.; ZUCCHI, O.; DIAS, D. Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 6, p. 415-421, 2004.

VALENTIN, Y. Y., DALTO, A. G., DE SOUZA GESTINARI, L. M. Benthic macroalgae diversity in admiralty bay (king george island, south shetland islands, antarctic peninsula) **Annual Activity Report**, 2010.

XIAO, X.-H.; YUAN, Z.-Q.; LI, G.-K. Preparation of phytosterols and phytol from edible marine algae by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 104, p. 284-289, 2013.

WIENCKE, C., AMSLER, C. D. Seaweeds and their communities in polar regions. *Seaweed Biology*. **Springer**, pp. 265-291, 2012.

4.2 Artigo 2

Extraction and Identification of sterols by LC-MS/MS mass spectrometry of brown macroalgae from Antarctica

Camila F. P. Nunes^a, Daiane Dias^b, Pio Colepicolo Neto^c, Ernani Pinto^c,
Leonardo Z. Villela^c and Claudio M. P. Pereira^{a*}

^aCentro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Laboratory of Lipidomic e Bioorganic (LLipidomicaBio) 96010-900, Campus Capão do Leão, RS, Brazil.

^bEscola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, 96201-900, Rio Grande, RS, Brazil

^cInstituto de Química, Universidade Federal de São Paulo, 05508-900 Cidade Universitária São Paulo, SP, Brazil

*Corresponding author at: Dr. Claudio Martin Pereira de Pereira, Center for Chemical Sciences, Pharmaceutical and Food, Federal University of Pelotas – UFPel, Campus Capão do Leão – Post office box 354 – CEP 96010-900 – Pelotas – RS – Brazil

E-mail: claudiochemistry@gmail.com

Abstract

This work proposes, for the first time, the extraction and quantification of sterols in six species of brown Antarctic macroalgae: *Adenocystis ultricularis*, *Ascoseira mirabilis*, *Cystosphaera jacquiniotii*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia antarctica* and *Hymantothallus grandifolius*. Ultrasound was used as promoter media to extract sterols from algal biomass. The extracts were analyzed by High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometer (LC-MS/MS) and the sterols (ergosterol, brassicasterol, fucosterol, β -sitosterol, campesterol, cholesterol and stigmasterol) were quantified. As result, fucosterol was the most abundant followed by β -sitosterol and stigmasterol, in five out of six algae examined. The sterol campesterol was found in lower concentrations.

Keywords: Marine brown algae; *Phaeophyceae*; Antarctic regions; sterols;

1 Introduction

In general, macroalgae are classified into *Phaeophyceae* (brown algae), *Chlorophyceae* (green algae) and *rhodophyceae* (red algae) (Bouzidi *et al.*, 2008). In this context, it is important to mention that brown algae are found in considerable quantities in the seas of polar and temperate regions (Lopes *et al.*, 2011). The Antarctic continent is rich in a unique diversity, having an interesting amount of endemic algae species adapted to the cold (Godinho *et al.*, 2013; Gambato *et al.*, 2014). The brown Antarctic macroalgae are mainly represented by the dominance of the algae order Desmarestiales; such as *Himantothallus grandifolius*, *Desmarestia anceps* and *Cystosphaera jacquinoti* (Valentin *et al.*, 2010; Wiencke e Amsler, 2012).

Algae represent a rich source of sterols, which play an important role in regulating the cell membrane (Lopes *et al.*, 2011; Grattan, 2013). The algal sterols show a diverse compositions with significant variability between different macroalgae (El Hattab *et al.*, 2006). In their recent studies of the evaluation of brown macroalgae, LOPES *et al.*, (2011) show that fucosterol is the dominant sterol found. An analysis of different green algae on the other hand found no dominant sterol (Kumari *et al.*, 2013). Sterols have different biological activities such as anti-inflammatory, antioxidant, antidiabetic and anticarcinogenic (Louw *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2003; Lagarda *et al.*, 2006; Mackay e Jones, 2012; Ma *et al.*, 2013).

The development of advanced techniques for the isolation and characterization of these sterols is essential for understanding the chemical composition of algae (Slavin e Yu, 2012). In general, analysis of sterols has traditionally been carried out by gas chromatography with flame ionization detection (GC/FID) or gas chromatography with detection by mass spectrometer (GC-MS) (Lopes *et al.*, 2013). However, for determination by gas chromatography a derivatization step of the sample is necessary (Bedner *et al.*, 2008). Thus, liquid chromatography has been assigned for the analysis of sterols thereby avoiding the derivatization step (Mo *et al.*, 2013; Mendiara *et al.*, 2015).

Sterols are also derived from the same squalene precursor as hopanoids but, in marked contrast, they are known to have an oxygen-dependent biosynthesis beginning with the formation of the first intermediate, 2,3- oxidosqualene (Moreau *et al.*, 2002). There is a close connection between modern-day biosynthesis of particular

triterpenoid biomarkers and the presence of molecular oxygen in the environment (Lopes *et al.*, 2011). Besides, it is essential to emphasize the importance of the algae in the environment, bearing in mind that these organisms are part of the food chain in the polar aquatic environment. In this connection it is relevant carry out studies related to the composition of brown Antarctic macroalgae, especially lipids and their derivatives. As a continuation of the studies on the lipids from algae species and their metabolites, ultrasound assisted extraction and quantification of sterols in six species of brown Antarctic macroalgae: *Adenocystis ultricularis*, *Ascoseira mirabilis*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia antarctic* and *Hymantothallus grandifolius* using LC-MS/MS are addressed.

2 Materials and Methods

Reagents and Chemicals

Standards of cholesterol (99%), brassicasterol (87%), campesterol (65%), ergosterol (95%), fucosterol (93%), stigmasterol (95%), β -sitosterol (95%), and campesterol (65%) were obtained from Sigma (St. Louis, MO, USA) and prepared in HPLC grade isopropanol (Honeywell Burdick and Jackson, USA). HPLC grade acetonitrile was purchased from Honeywell Burdick and Jackson (USA) and n-hexane and ethanol from Merck (Darmstadt, Germany). Sodium chloride, potassium hydroxide and anhydrous sodium sulfate were obtained from Panreac (Castellar del Valle`s, Spain).

Samples

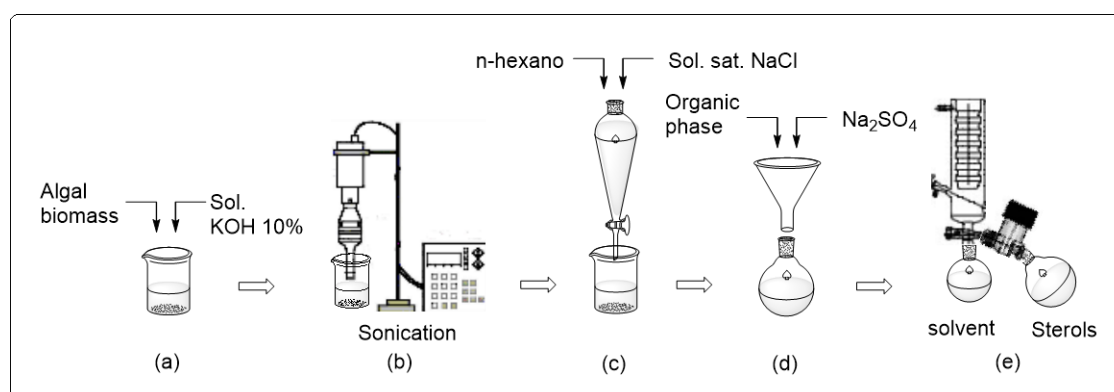
Samples of brown macroalgae were collected in different parts of the Antarctica. Macroalgae *A. mirabilis*, *C. jacquinotii*, *D. anceps*, *D. Antarctic* and *H. grandifolius* were collected in January 2012 and *A. ultricularis* in December 2013, as described in **Table 1**.

Table 1: Macroalgae collected in Antarctica in different sites, coordinates and dates.

Macroalgae	Site	Coordinates	Date of Collection
<i>Ascoseira mirabilis</i>	Punta Plaza	62° 5' x 58° 25'	13/01/2012
<i>Cystosphaera jacquinotii</i>	Punta Henrequinn	62° 7' x 58° 23'	16/01/2012
<i>Desmarestia anceps</i>	Punta Plaza	62° 5' x 58° 25'	13/01/2012
<i>Desmarestia antarctic</i>	Demay	62° 13' x 58° 26'	27/01/2012
<i>Hymantothallus grandifolius</i>	Punta Plaza	62° 5' x 58° 24'	29/01/2012
<i>Adenocystis ultricularis</i>	Punta Hannah	62° 39' x 60° 37'	05/12/2013

Sterol Extractions

1g of freeze-dried algal biomass was added in a 25 ml beaker and then (a) saponified with 40 ml of ethanolic KOH solution at 10% and later (b) sonicated by ultrasound for 20 minutes at room temperature (25°C). After the indicated time, the sample was transferred to a separatory funnel with 20 mL of saturated NaCl and 10 mL hexane, and the extraction process was repeated twice (c). The hexane extracts were combined and dried with anhydrous sodium sulfate, filtered (d) and the solvent evaporated to dryness (e) (**scheme 1**). The sample was resuspended in 200µL acetonitrile for analysis using LC-MS/MS.

**Scheme 1:** Schematic representation of the sterol extraction steps used in this study.

Analysis of Sterols by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS / MS)

The sterols present in the six brown Antarctic macroalgae were quantified in a liquid chromatograph coupled to a Quadrupole Linear Ion Trap LC / MS / MS Mass Spectrometer, model 3200 Q Trap (AB Sciex Instruments) with the ionization source Atmospheric Pressure Chemical Ionization (APCI) - Temperature source = 300 ° C, Corona Current = 4 uA. A C18 50 x 2.1 mm, 2.6um (Kinetix Phenomenex) analytical column maintained at 30 °C was used, and the analysis time was 4 minutes on isocratic mode, and the HPLC grade acetonitrile for the mobile phase (Mo *et al.*, 2013).

3 Results and Discussion

The sterol composition of the six brown Antarctic macroalgae: *Adenocystis ultricularis*, *Ascoseira mirabilis*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia antarctica* and *Hymantothallus grandifolius* was determined by Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) (**Figure 2**). Liquid chromatography-tandem mass spectrometry is an ideal platform for multi-analyte quantification. When operated in multiple reaction monitoring (MRM) mode, this method allows quantification of low-level metabolites within a complex matrix in a high sensitivity and selectivity manner (Guo *et al.*, 2012; Yan *et al.*, 2014). Because of these features, MRM has become a gold standard for quantification in new drug discovery assays in pharmaceutical companies (Ramanathan *et al.*, 2011) and has wide application in the research field, e.g. targeted metabolomics (Guo *et al.*, 2012), proteomics (Percy *et al.*, 2012), post-translation modification (Huang *et al.*, 2014) etc. According to the analysis, the determination of the ergosterol, brassicasterol, fucosterol, β -sitosterol, campesterol, cholesterol and stigmasterol was possible, with retention times of: 1:55, 1.69, 1.97, 2.00, 2:04, 2:08 and 2.80, respectively (**Figure 1**).

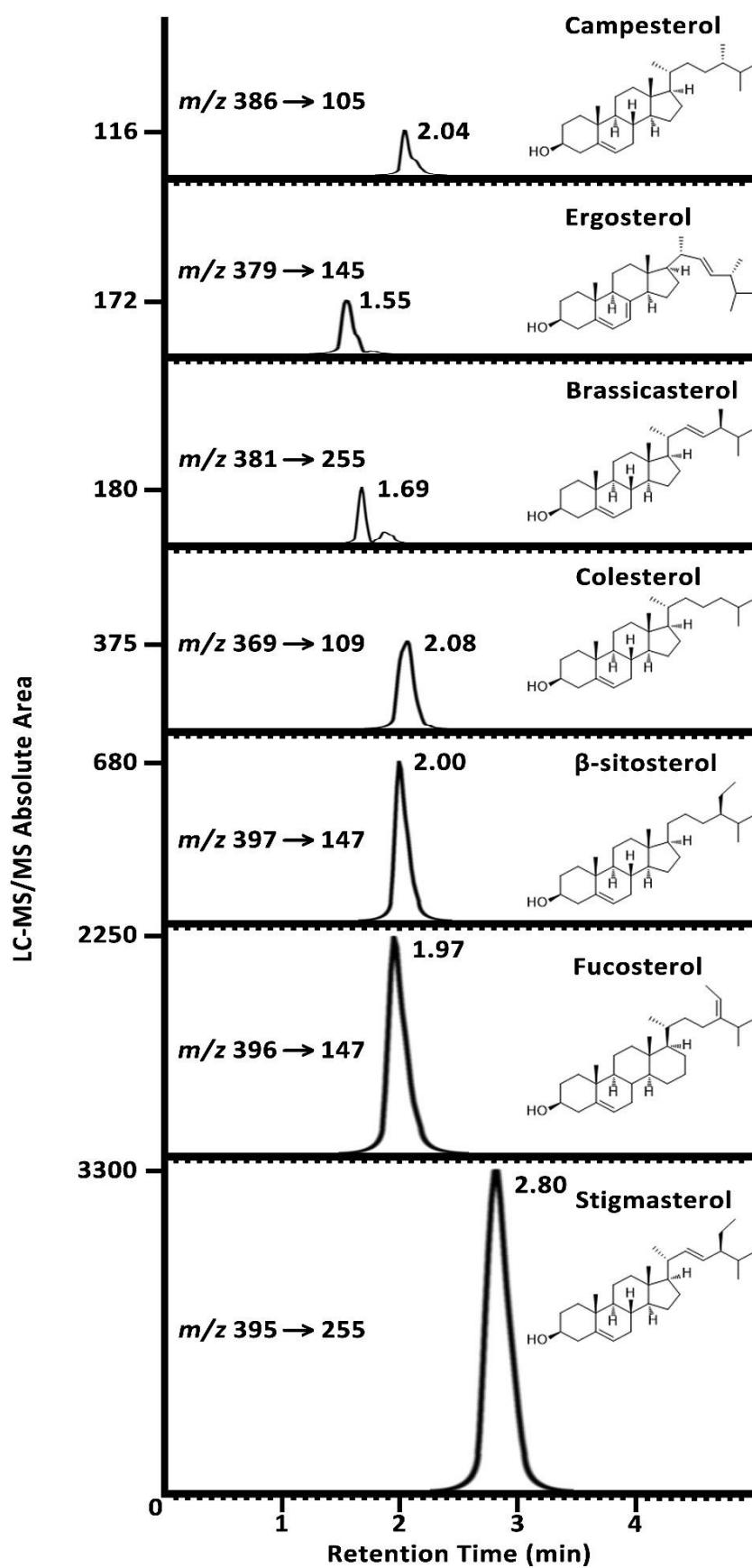


Figure 1 - Positive ion LC-MS/MS chromatograms of sterols in Antarctic macroalgae.

The values of total concentration of these sterols ranged from 443.51 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in macroalgae *H. grandifolus* to 123.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in macroalgae *D. antarctica*. The seven sterols were quantified in all samples, and fucosterol was the major sterol present in five of the six macroalgae. The levels of β -sitosterol and stigmasterol were also higher when compared with the rest of the compounds and campesterol was the least identified compound in all macroalgae (**Table 3**).

In the *D. antarctica*, cholesterol was found at the highest compound concentration (35.87 $\mu\text{g mL}^{-1}$) followed by fucosterol (33.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and β -sitosterol (26.43 $\mu\text{g mL}^{-1}$), these sterols represent 29%, 27% and 21.5% of the composition of this macroalgae respectively.

Fucosterol, stigmasterol and ergosterol are present in the highest concentration in *H. grandifolus* representing 54%, 17% and 9% of the total sterol composition of the sample, respectively. *D. anceps* contains the second highest level of fucosterol among the analyzed samples (183.67 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and fucosterol, stigmasterol and β -sitosterol content represent 55%, 16% and 10% of the total composition of sterols, respectively (**Table 4**).

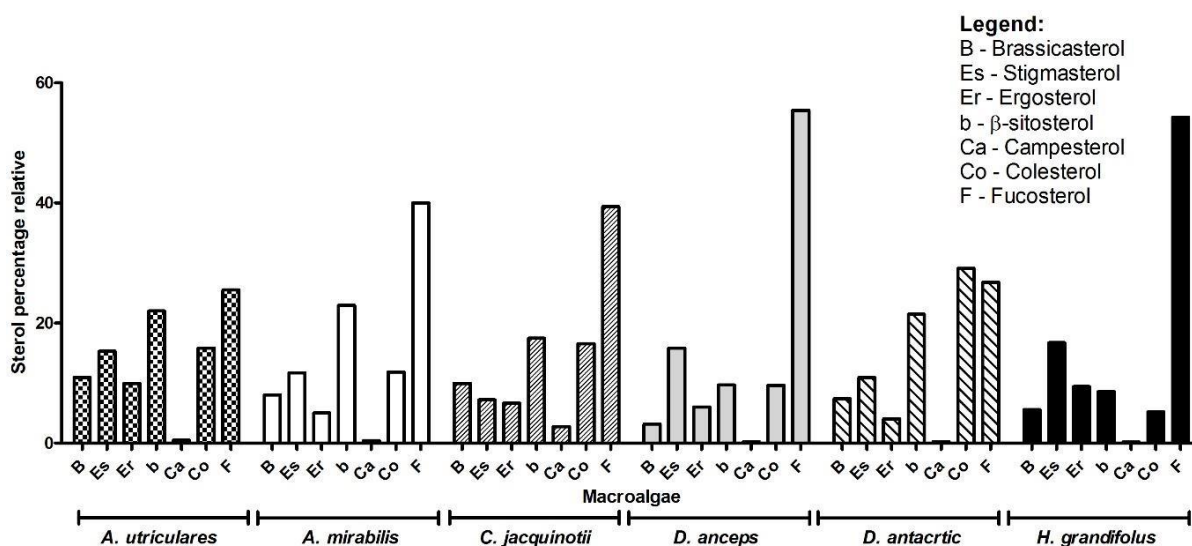


Figure 2 - Sterol concentrations ($\mu\text{g mL}^{-1}$) present in six brown Antarctic macroalgae obtained by LC-MS / MS.

Table 3: Quantification of brown Antarctic macroalgae sterols ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Sterols	concentration ($\mu\text{g/mL}$) Sterols					
	A. <i>utricularis</i>	A. <i>mirabilis</i>	C. <i>jacquinotii</i>	D. <i>Anceps</i>	D. <i>antactrica</i>	H. <i>grandifolus</i>
Brassicasterol	30.5	28.80	31.43	10.47	9.13	24.70
Stigmasterol	42.73	42.03	22.83	52.43	13.47	74.20
Ergosterol	27.63	18.10	21.03	19.93	4.98	41.77
β -sitosterol	61.43	82.47	55.23	32.07	26.43	38.07
Campesterol	1.35	1.49	8.69	0.76	0.33	0.90
Cholesterol	44.13	42.47	52.43	31.90	35.87	23.20
Fucosterol	71.17	143.67	124.67	183.67	33.00	240.67
Total	278.94	359.03	316.30	331.23	123.30	443.51

Table 4: Sterols percentages found in the six species of brown Antarctic macroalgae

Sterols	% Relative steroids					
	A. <i>utricularis</i>	A. <i>mirabilis</i>	C. <i>jacquinotii</i>	D. <i>Anceps</i>	D. <i>antactrica</i>	H. <i>grandifolus</i>
Brassicasterol	11	8	10	3	7	6
Stigmasterol	15	12	7	16	11	17
Ergosterol	10	5	7	6	4	9
β -sitosterol	22	23	17.5	9	21.5	8.5
Campesterol	0.5	0.4	3	0.2	0.3	0.2
Cholesterol	16	12	16.5	10	29	5
Fucosterol	25.5	40	39	55.5	27	54

In this analysis, the sterols of macroalgae from the Antarctic environment correspond to the same found in studies reported by LOPES et. al., (2011), who studied the macroalgae on the coast of Portugal. Regarding this study, Kapetanovic et. al., (2005) showed similar sterol ratio for the macroalgae of the Adriatic Sea. In this sense, these results correlate positively with the identification of fucosterol in a greater proportion. From both studies, it can be seen that the fucosterol was one of the sterols found in a high proportion, along with the high cholesterol content reported (**Table 5**), these results are similar to those found in our studies with the macroalgae.

Table 5: Literature data on Sterols found in *Phaeophyta* macroalgae.

Brown algae	Cholestero 	Fucosterol	Ergostero 	β -sitosterol	Ref.
<i>Fucus spiralis</i>	7%	87%	-	-	[Lopes, 2011]
<i>Sargassum vulgare</i>	8%	85%	0,1%	0,3%	[Lopes, 2011]
<i>Cystoseira tamariscifolia</i>	8%	81%	-	0,3%	[Lopes, 2011]
<i>Cystoseira adriática</i>	40%	5%	-	-	[Kapetanovic, 2005]
<i>Padina pavonica</i>	10%	73%	-	5%	[Lopes, 2011]
<i>Fucus virsoides</i>	-	92%	-	-	[Kapetanovic, 2005]
<i>Cladostephus spongiosus</i>	17%	71%	-	-	[Lopes, 2011]
<i>Stypocaulon scoparium</i>	13%	73%	0,6%	2%	[Lopes, 2011]
<i>Halopteris filicina</i>	10%	81%	-	3%	[Lopes, 2011]
<i>Cystoseira usneoides</i>	4%	95%	-	-	[Lopes, 2011]
<i>Cystoseira nodicaulis</i>	6%	92%	-	-	[Lopes, 2011]
<i>Saccorhiza polyschides</i>	4%	85%	-	8%	[Lopes, 2011]

Table 4 shows the results of the sterol analysis of the macroalgae *A. utricularis* and *D. antarctica*, it is possible to see the high concentration of cholesterol and fucosterol. These compounds are usually present in high proportions in brown algae because cholesterol is the precursor for biosynthesis of fucosterol (Bhakuni e Rawat, 2005). Even under conditions different from the Antarctic environment, liquid chromatography analysis of brown macroalgae, it was found that fucosterol was greater than 70% (**Table 5**). It is important to report that in the case of Antarctic macroalgae, it is difficult to draw a comparison. In the frozen continent, the aquatic environment has temperatures below 0 °C (Siddall *et al.*, 2010). These Antarctic macroalgae are being analyzed for the first time. The analysis of Liquid chromatography-tandem mass spectrometry made it possible to visualize some very impressive results, such as the perceptual ergosterol found in brown macroalgae, covering a range of 4-10% (**Table 4**), and β -sitosterol covering a range of 8.5-23%. From the results of literature (**Table 5**) ergosterol reached a maximum rate of 0.6% and the β -sitosterol appears with values reaching a perceptual 8%. In addition, the data found in this research revealed a significant percentage of the rarely analyzed brassicasterol and campesterol in these matrices which presented 11% in *A. utricularis* and 3% in *C. jacquinotii*.

Another factor that is relevant to mention is the interfering abiotic, such as temperature throughout the year and salinity variation which can also influence the concentration of sterols in macroalgae (Kumari *et al.*, 2013). The studies revealed

positive data. The extraction of algae-derived sterols is not simple. Algae from icy environments present a tough cell membrane, making it lipid extraction difficult, the procedure used for the extraction of sterols lipid medium was viable. Later, a modern technique in liquid chromatography was applied allowing the analysis of seven sterols in brown Antarctic macroalgae for the first time. The results reported herein will be part of interesting data for future comparative studies to monitor these metabolites present in algae. It is important to stress that algae are the basis of the aquatic food chain and any modification of its chemical composition can directly influence the marine environment.

Conclusion

The sterol composition of six brown *Antarctic* macroalgae, *A. utricular*, *A. mirabilis*, *C. jacquinotii*, *D. anceps*, *D. antarctica* and *H. Grandifolus* were determined by Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and seven sterols were identified, this method proved effective in the quantification of these important lipids. The results revealed specific data, which to date had not yet been reported for brown Antarctic macroalgae. Significant levels of fucosterol were found. Other sterols such as campesterol and brassicasterol, not yet well studied in algae so far were also identified. Because of the biochemical importance of sterols and the role of algae in the environment, the study of the composition of these compounds in these organisms is of significant value for future studies in this still preserved region.

Acknowledgement

The authors are grateful to CNPq, FAPERGS and CAPES for financial and fellowship support.

References

- BHAKUNI, D. S., RAWAT, D. S. **Bioactive marine natural products**. Springer, 2005.
- BOUZIDI, N., DAGHBOUCHE, Y., EL HATTAB, M., ALICHE, Z., CULIOLI, G., PIOVETTI, L., GARRIGUES, S., DE LA GUARDIA, M. Determination of total sterols in brown algae by Fourier transform infrared spectroscopy. **Analytica chimica acta**, v.616, p.185-189, 2008.
- EL HATTAB, N., DAGHBOUCHE, Y., HATTAB, M. E., PIOVETTI, L., GARRIGUES, S., GUARDIA, M. D. L., FTIR-determination of sterols from the red alga *Asparagopsis armata*: Comparative studies with HPLC. **Talanta**, v.68, p.1230-1235, 2006.
- GAMBATO, G., BARONI, É. G., GARCIA, C. S., FRASSINI, R., FROZZA, C. O., MOURA, S., PEREIRA, C. M., FUJII, M. T., COLEPICOLO, P., LAMBERT, A. P. F. Brown Algae *Himantothallus grandifolius* (Desmarestiales, Phaeophyceae)

Suppresses Proliferation and Promotes Apoptosis-Mediated Cell Death in Tumor Cells. **Advances in Biological Chemistry**, v.4, p.98, 2014.

GODINHO, V. M., FURBINO, L. E., SANTIAGO, I. F., PELLIZZARI, F. M., YOKOYA, N. S., PUPO, D., ALVES, T. M., JUNIOR, P. A., ROMANHA, A. J., ZANI, C. L. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **The ISME journal** 7, p.1434-1451, 2013.

GRATTAN, B. J. Plant sterols as anticancer nutrients: evidence for their role in breast cancer. **Nutrients**, v.5, p.359-387, 2013.

GUO, B., CHEN, B., LIU, A., ZHU, W., YAO, S. Liquid chromatography-mass spectrometric multiple reaction monitoring-based strategies for expanding targeted profiling towards quantitative metabolomics. **Current drug metabolism**, v.13, p.1226-1243, 2012.

HUANG, J., WANG, F., YE, M., ZOU, H. Enrichment and separation techniques for large-scale proteomics analysis of the protein post-translational modifications. **Journal of Chromatography A**, v.1372, p.1-17, 2014.

KAPETANOVIĆ, R., SLADIĆ, D. M., POPOV, S., ZLATOVIĆ, M. V., KLJAJIĆ, Z., GAŠIĆ, M. J. Sterol composition of the Adriatic Sea algae *Ulva lactuca*, *Codium dichotomum*, *Cystoseira adriatica* and *Fucus virsoides*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v.70, p.1395-1400, 2005.

KUMARI, P.; KUMAR, M.; REDDY, C.; JHA, B. Algal lipids, fatty acids and sterols. In: Herminia Domínguez. **Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals**, Philadelphia: Woodhead Publishing, p.87-132, 2013.

LAGARDA, M., GARCIA-LLATAS, G., FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v.41, p.1486-1496, 2006.

LEE, S., LEE, Y. S., JUNG, S. H., KANG, S. S., SHIN, K. H. Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*. **Archives of pharmacal research**, v. 26, p.719-722, 2003.

LOPES, G., SOUSA, C., BERNARDO, J., ANDRADE, P. B., VALENTÃO, P., FERRERES, F., MOUGA, T. Sterol profiles in 18 macroalgae of the portuguese coast1. **Journal of Phycology**, v. 47, p. 1210-1218, 2011.

LOPES, SOUSA, C.; VALENTÃO, P.; Andrade, P. Sterols in Algae and Health. In: Hernández-Ledesma, B.; Herrero, M. **Bioactive Compounds from Marine Foods Plant and Animal Sources**, p.173-187, 2013.

LOUW, I., HALLAND, A., BOUIC, P., FREESTONE, M., Lamprecht, J. A pilot study of the clinical effects of a mixture of beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside in active rheumatoid arthritis (RA). **American Journal Of Clinical Nutrition**, v.75, n.2, p.351S-351S, 2002.

MA, L., CHEN, H., DONG, P., LU, X. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. **Food chemistry**, v.139, p.503-508, 2013.

MACKAY, D. S., JONES, P. J. Plasma noncholesterol sterols: current uses, potential and need for standardization. **Current opinion in lipidology**, v.23, p.241-247, 2012.

- MENDIARA, I., BENTAYEB, K., NERÍN, C., DOMÉÑO, C. Online solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry to determine free sterols in human serum. **Talanta**, v.132, p.690-697, 2015.
- MO, S., DONG, L., HURST, W. J., VAN BREEMEN, R. B., Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Lipids**, v.48, p.949-956, 2013.
- MOREAU, R. A., WHITAKER, B. D., HICKS, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. **Progress in lipid research**, v.41, p.457-500, 2002.
- PERCY, A. J., CHAMBERS, A. G., SMITH, D. S., BORCHERS, C. H. Standardized protocols for quality control of MRM-based plasma proteomic workflows. **Journal of proteome research**, v.12, p.222-233, 2012.
- RAMANATHAN, R., JEMAL, M., RAMAGIRI, S., XIA, Y. Q., HUMPREYS, W. G., OLAH, T., KORFMACHER, W. A. It is time for a paradigm shift in drug discovery bioanalysis: from SRM to HRMS. **Journal of Mass Spectrometry**, 46, 595-601, 2011.
- SIDDALL, M., KAPLAN, M. R., SCHAEFER, J. M., PUTNAM, A., KELLY, M. A., GOEHRING, B. Changing influence of Antarctic and Greenlandic temperature records on sea-level over the last glacial cycle. **Quaternary Science Reviews**, 29, 410-423, 2010.
- SLAVIN, M., YU, L. L. A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans. **Food chemistry**, 135, 2789-2795, 2012.
- VALENTIN, Y. Y., DALTO, A. G., DE SOUZA GESTINARI, L. M. Benthic macroalgae diversity in admiralty bay (king george island, south shetland islands, antarctic peninsula) **Annual Activity Report**, 2010.
- WIENCKE, C., AMSLER, C. D. Seaweeds and their communities in polar regions. **Seaweed Biology**. Springer, pp. 265-291, 2012.
- YAN, Z., LIN, G., YE, Y., WANG, Y., YAN, R. A generic multiple reaction monitoring based approach for plant flavonoids profiling using a triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry** 25, 955-965, 2014.

5 Conclusão

Com base nas metodologias empregadas, conclui-se que:

- 1) Através da análise cromatográfica o ultrassom foi o meio promotor mais eficiente para extração dos esteróis da macroalga *Desmarestia anceps*;
- 2) Que o esterol em maior proporção na maioria das macroalgas *Phaeophyceae* da Antártica foi o fucosterol, seguido do estigmasterol e β -sitosterol. O campesterol foi o que apresentou a menor concentração.
- 3) Cabe também que estes estudos de extração e identificação de esteróis foram realizados pela primeira vez em macroalgas da Antártica. Sendo importante para futuros estudos uma vez que essas biomoléculas foram biossintetizados em condições especiais e extremas. Nesse contexto, essas análises podem constituir uma base de dados que podem ser consultados e comparados em um futuro próximo, em que o ambiente Antártico estiver modificado devido a fatores ambientais.

6 Referências

- ABIDI, S. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. **Journal of chromatography A**, v. 935, n. 1, p. 173-201, 2001.
- ADAM, F. et al. "Solvent-free" ultrasound-assisted extraction of lipids from fresh microalgae cells: a green, clean and scalable process. **Bioresource technology**, v. 114, p. 457-465, 2012.
- ARAÚJO, G. S. et al. Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: prospection of the optimal extraction method. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 1, p. 95-98, 2013.
- BARGAGLI, R. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. **Science of the Total Environment**, v. 400, n. 1, p. 212-226, 2008.
- BARRERA-ORO, E. The role of fish in the Antarctic marine food web: differences between inshore and offshore waters in the southern Scotia Arc and west Antarctic Peninsula. **Antarctic Science**, v. 14, n. 04, p. 293-309, 2002.
- BARRIUSO, B. et al. Sterols heating: Degradation and formation of their ring-structure polar oxidation products. **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 706-712, 2012.
- BEDNER, M. et al. Development of liquid chromatographic methods for the determination of phytosterols in Standard Reference Materials containing saw palmetto. **Journal of Chromatography A**, v. 1192, n. 1, p. 74-80, 2008.
- BHAKUNI, D. S.; RAWAT, D. S. **Bioactive Marine Natural Products**. Springer, 2005.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BOUZIDI, N. et al. Determination of total sterols in brown algae by Fourier transform infrared spectroscopy. **Analytica Chimica ACTA**, v. 616, n. 2, p. 185-189, 2008.
- BRADFORD, P. G.; AWAD, A. B. Phytosterols as anticancer compounds. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, n. 2, p. 161-170, 2007.
- BRUFAU, G.; CANELA, M. A.; RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**, v. 28, n. 4, p. 217-225, 2008.

DA SILVA, A. P. A Política Externa Brasileira para os grandes espaços: o espaço cósmico, a Antártida e a expansão da Plataforma Continental. **Século XXI**, v. 2, n. 2, p. 105-120, 2012.

DE BOER, K. et al. Extraction and conversion pathways for microalgae to biodiesel: a review focused on energy consumption. **Journal of Applied Phycology**, v. 24, n. 6, p. 1681-1698, 2012.

DE STEFANI, E. et al. Plant sterols and risk of stomach cancer: a case-control study in Uruguay. **Nutrition and Cancer**, v. 37, n. 2, p. 140-144, 2000.

DESHMANE, V. G.; GOGATE, P. R.; PANDIT, A. B. Ultrasound assisted synthesis of isopropyl esters from palm fatty acid distillate. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 16, n. 3, p. 345-350, 2009.

DOMINGUEZ, H. **Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals**. Elsevier, 2013.

DOS SANTOS, M. A. et al. Profile of Bioactive Compounds in Avocado Pulp Oil: Influence of the Drying Processes and Extraction Methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 91, n. 1, p. 19-27, 2014.

EL HATTAB, N. et al. FTIR-determination of sterols from the red alga *Asparagopsis armata*: Comparative studies with HPLC. **Talanta**, v. 68, n. 4, p. 1230-1235, 2006.

FRANCAVILLA, M.; TROTTA, P.; LUQUE, R. Phytosterols from *Dunaliella tertiolecta* and *Dunaliella salina*: A potentially novel industrial application. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 11, p. 4144-4150, 2010.

GAMBATO, G. et al. Brown Algae *Himantothallus grandifolius* (Desmarestiales, Phaeophyceae) Suppresses Proliferation and Promotes Apoptosis-Mediated Cell Death in Tumor Cells. **Advances in Biological Chemistry**, v. 4, n. 02, p. 98, 2014.

GERASIMENKO, N.; BUSAROVA, N.; MOISEENKO, O. Seasonal changes in the content of lipids, fatty acids, and pigments in brown alga *Costaria costata*. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 57, n. 2, p. 205-211, 2010.

GINER, J.-L.; ZHAO, H.; TOMAS, C. Sterols and fatty acids of three harmful algae previously assigned as *Chattonella*. **Phytochemistry**, v. 69, n. 11, p. 2167-2171, 2008.

GODINHO, V. M. et al. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. **The ISME Journal**, v. 7, n. 7, p. 1434-1451, 2013.

GOULD, S. B. Evolutionary genomics: Algae's complex origins. **Nature**, v. 492, n. 7427, p. 46-48, 2012.

GRAEVE, M. et al. Fatty acid composition of Arctic and Antarctic macroalgae: indicators for phylogenetic and trophic relationships. **Marine Ecology-progress Series**, v. 231, p. 67-74, 2002.

GRATTAN, B. J. Plant sterols as anticancer nutrients: evidence for their role in breast cancer. **Nutrients**, v. 5, n. 2, p. 359-387, 2013.

GUO, B. et al. Liquid chromatography-mass spectrometric multiple reaction monitoring-based strategies for expanding targeted profiling towards quantitative metabolomics. **Current Drug Metabolism**, v. 13, n. 9, p. 1226-1243, 2012.

HOBUSS, C.; Rosales, P.; Venzke, D.; Souza, P.; Gobbi, P.; Gouvea, L.; Santos, M.; Pinto, E.; Jacob-Lopes, E.; Pereira, C. Cultivation of algae in photobioreactor and obtention of biodiesel. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 2, p. 361-364, 2011.

HOBUSS, C.; Venzke, D.; Pacheco, B.; Souza, A.; Santos, M.; Quina, F.; Fiametti, K.; Oliveira, J.; Pereira, C. Ultrasound-assisted synthesis of aliphatic acid esters at room temperature. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 3, p. 387-389, 2012.

HUANG, J. et al. Enrichment and separation techniques for large-scale proteomics analysis of the protein post-translational modifications. **Journal of Chromatography A**, v. 1372, p. 1-17, 2014.

INDYK, H. Simultaneous liquid chromatographic determination of cholesterol, phytosterols and tocopherols in foods. **Analyst**, v. 115, n. 12, p. 1525-1530, 1990. ISSN 1364-5528.

KAPETANOVIĆ, R. et al. Sterol composition of the Adriatic Sea algae *Ulva lactuca*, *Codium dichotomum*, *Cystoseira adriatica* and *Fucus virsoides*. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 70, n. 12, p. 1395-1400, 2005.

KUMARI, P.; Kumar, M.; Reddy, C.; Jha, B. Algal lipids, fatty acids and sterols. In: Herminia Domínguez. **Functional ingredients from algae for foods and nutraceuticals**, Philadelphia: Woodhead Publishing, p.87-132, 2013.

KUMARI, P.; REDDY, C.; JHA, B. Comparative evaluation and selection of a method for lipid and fatty acid extraction from macroalgae. **Analytical Biochemistry**, v. 415, n. 2, p. 134-144, 2011.

LAGARDA, M.; GARCIA-LLATAS, G.; FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 1486-1496, 2006.

LEAL, M.; Calado, R.; Munro, M.; Blunt, J.; Puga, J.; Jesus, B.; Rosa, R.; Madeira, C. Biogeography and biodiscovery hotspots of macroalgal marine natural products. **Natural Product Reports**, v. 30, n. 11, p. 1380-1390, 2013.

LEE, R. E. **Phycology**. Cambridge University Press, 2008.

LEE, S.; Sang, H.; Sam, S.; Yeon, S.; Kuk, H. Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, n. 9, p. 719-722, 2003.

LEONG, W.; Che M.; Yaakob B.; Tan, C.; Leong, W.; Lai, O.; Long, K.; Misran, M. Preparation and characterisation of water-soluble phytosterol nanodispersions. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 77-83, 2011.

LIU, S.; RUAN, H. A highly sensitive quantification of phytosterols through an inexpensive derivatization. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 166, p. 18-25, 2013.

LOPES, G.; Sousa, C.; Bernardo, J.; Andrade, P.; Valentão, P.; Ferreres, F.; Mouga, T. Sterol profiles in 18 macroalgae of the portuguese coast. **Journal of Phycology**, v.47, n.5, p.1210-1218, 2011.

LOPES, G.; Sousa, C.; Valentão, P.; Andrade, P. Sterols in Algae and Health. In: Hernández-Ledesma, B.; Herrero, M. **Bioactive Compounds from Marine Foods Plant and Animal Sources**, p.173-187, 2013.

LOURENÇO, S. O. **Cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. RiMa Rio de Janeiro, 2006.

LOUW, I.; Halland, A.; Bouic, P.; Freestone, M.; Lamprecht, J. A pilot study of the clinical effects of a mixture of beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside in active rheumatoid arthritis (RA). **American Journal Of Clinical Nutrition**, v.75, n.2, p.351S-351S, 2002.

MA, L.; Chen, H.; Dong, P.; Lu, X. Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1, p. 503-508, 2013.

MACKAY, D. S.; JONES, P. J. Plasma noncholesterol sterols: current uses, potential and need for standardization. **Current Opinion in Lipidology**, v. 23, n. 3, p. 241-247, 2012.

MENDIARA, I.; Bentayeb, K.; Nerín, C.; Domeño, C. Online solid-phase extraction–liquid chromatography–mass spectrometry to determine free sterols in human serum. **Talanta**, v. 132, p. 690-697, 2015.

MENÉNDEZ-CARREÑO, M.; STEENBERGEN, H.; JANSSEN, H.-G. Development and validation of a comprehensive two-dimensional gas chromatography–mass spectrometry method for the analysis of phytosterol oxidation products in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 6, p. 2023-2032, 2012.

MERCER, P.; ARMENTA, R. E. Developments in oil extraction from microalgae. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 113, n. 5, p. 539-547, 2011.

MO, S.; Dong, L.; van Breemen, R.; Hurst, W. Quantitative Analysis of Phytosterols in Edible Oils Using APCI Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. **Lipids**, v. 48, n. 9, p. 949-956, 2013.

MOLINSKI, T.; Dalisay, D.; Lievens, S.; Saludes, J.; Lievens, S.; Saludes, J. Drug development from marine natural products. **Nature reviews Drug discovery**, v. 8, n. 1, p. 69-85, 2009.

MOREAU, R. A.; WHITAKER, B. D.; HICKS, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. **Progress in Lipid Research**, v. 41, n. 6, p. 457-500, 2002.

NEĐZAREK, A. Sources, diversity and circulation of biogenic compounds in Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. **Antarctic Science**, v. 20, n. 02, p. 135-145, 2008.

OROZCO-SOLANO, M.; RUIZ-JIMÉNEZ, J.; LUQUE DE CASTRO, M. Ultrasound-assisted extraction and derivatization of sterols and fatty alcohols from olive leaves and drupes prior to determination by gas chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 8, p. 1227-1235, 2010.

PACHECO, B.; Nunes, C.; Rockembacha, C.; Bertellib, P.; Meskoc, M.; Roesch-Elyd, M.; Mourab, S.; Pereira, C.; Eco-friendly synthesis of esters under ultrasound with p-toluenesulfonic acid as catalyst. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 7, n. 3, p. 265-270, 2014.

PERCY, A.; Chambers, A.; S.; Borchers, C.; Borchers, C. Standardized protocols for quality control of MRM-based plasma proteomic workflows. **Journal of Proteome Research**, v. 12, n. 1, p. 222-233, 2012.

RAMANATHAN, R.; Jemal, M.; Ramagiri, S.; Xia, Y.; Humpreys, W.; Olah, T.; Korfmacher, W. It is time for a paradigm shift in drug discovery bioanalysis: from SRM to HRMS. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 46, n. 6, p. 595-601, 2011.

RANJAN, A.; PATIL, C.; MOHOLKAR, V. S. Mechanistic assessment of microalgal lipid extraction. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 6, p. 2979-2985, 2010.

RAVEN, P. H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. **Biologia Vegetal**, 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2007. 906p.

ROCHE, J.; Alignan, Marion ; Bouniols, A.; Cerny, M.; Mouloungui, Z.; Merah, O. Sterol concentration and distribution in sunflower seeds (*Helianthus annuus* L.) during seed development. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1451-1456, 2010.

ROSA, K. K.; VIEIRA, R.; SIMÕES, J. C. Dinâmica Glacial e Características Sedimentares Resultantes na Zona Proglacial da Geleira Ecology-Baía do Almirantado, Ilha Rei George Antártica. **Revista Brasileira de Geomorfologia**, v. 7, n. 2, 2006.

RYAN, E.; Galvin, K.; O'Connor, T.; Maguire, A.; O'Brien, N. Phytosterol, squalene, tocopherol content and fatty acid profile of selected seeds, grains, and legumes. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 62, n. 3, p. 85-91, 2007.

SAIEN, J.; ASADABADI, S. Salting-out effect of NaCl on the rate of mass transfer of liquid-liquid extraction in a two impinging-jets contacting device. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 41, n. 3, p. 295-301, 2010.

SCHINOR, E.; Salvador, M.; Turatti, I.; Zucchi, O.; Dias, D. Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n. 6, p. 415-421, 2004.

SIDDALL, M.; Kaplan, M.; Schaefer, J.; Kelly, M.; Goehring, B.; Putnam, A. Changing influence of Antarctic and Greenlandic temperature records on sea-level over the last glacial cycle. **Quaternary Science Reviews**, v. 29, n. 3, p. 410-423, 2010.

SILBERFELD, T.; Reviers, B.; Rousseau, F.; Leigh, J.; Verbruggen, H.; Cruaud, C. A multi-locus time-calibrated phylogeny of the brown algae (Heterokonta, Ochrophyta, Phaeophyceae): Investigating the evolutionary nature of the "brown algal crown radiation". **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, n. 2, p. 659-674, 2010.

SLAVIN, M.; YU, L. L. A single extraction and HPLC procedure for simultaneous analysis of phytosterols, tocopherols and lutein in soybeans. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 2789-2795, 2012.

TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.; TEW, K. Phytosterols in the prevention of human pathologies. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 57, n. 8, p. 321-325, 2003.

VALENTIN, Y.; DALTO, A.; DE SOUZA GESTINARI, L. Benthic macroalgae diversity in admiralty bay (king george island, south shetland islands, antarctic peninsula). **Annual Activity Report**, 2010.

VASKE, Y. M.; CREWS, P. An Update on the Biomedical Prospects of Marine-derived Small Molecules with Fascinating Atom and Stereochemical Diversity. In: Hernández-Ledesma, B.; Herrero, M. **Bioactive Compounds from Marine Foods Plant and Animal Sources**, p.1-26, 2013.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. D. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 139-145, 2004.

WIENCKE, C.; AMSLER, C. D. Seaweeds and their communities in polar regions. In: (Ed.). **Seaweed Biology**: Springer, 2012. p.265-291.

WULFF, A. et al. Biodiversity, biogeography and zonation of marine benthic micro-and macroalgae in the Arctic and Antarctic. **Botanica Marina**, v. 52, n. 6, p. 491-507, 2009. ISSN 1437-4323.

XIAO, X.-H.; YUAN, Z.-Q.; LI, G.-K. Preparation of phytosterols and phytol from edible marine algae by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 104, p. 284-289, 2013.

YAN, Z.; Lin, G.; Ye, Y.; Wang, Y.; Yan, R. A generic multiple reaction monitoring based approach for plant flavonoids profiling using a triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 25, n. 6, p. 955-965, 2014. ISSN

ZACHER, K.; Wiencke, C.; Rautenberger, R.; Hanelt, D.; Wulff, A. The abiotic environment of polar marine benthic algae. **Botanica Marina**, v. 52, n. 6, p. 483-490, 2009.

Anexo A

Atestado de Depósito de
Patente