

ISAC JOSÉ DA SILVA FILHO

**Estudo químico bioguiado da macroalga
marinha da Antártica *Desmarestia menziesii*
(Phaeophyceae) para isolamento de substâncias
com atividades biológicas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

SÃO PAULO

2018

ISAC JOSÉ DA SILVA FILHO

**Estudo químico bioguiado da macroalga
marinha da Antártica *Desmarestia menziesii*
(Phaeophyceae) para isolamento de substâncias
com atividades biológicas**

Dissertação apresentada ao Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de MESTRE em BIODIVERSIDADE VEGETAL E MEIO AMBIENTE, na Área de Concentração de Plantas Avasculares e Fungos em Análises Ambientais.

ORIENTADORA: DRA. LUCIANA RETZ DE CARVALHO

Ficha Catalográfica elaborada pelo **NÚCLEO DE BIBLIOTECA E MEMÓRIA**

Silva Filho, Isac José da
S586e Estudo químico bioguiado da macroalga marinha da Antártica *Desmarestia Menziesii* (Phaeophyceae) para isolamento de substâncias com atividades biológicas. / Isac José da Silva Filho -- São Paulo, 2018.
106p. ; il.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2018.
Bibliografia.

1. Algas extremófilas. 2. Manitol. 3. Anticongelante. I. Título.

CDU: 582.26

É necessário sempre acreditar que o sonho é possível

Que o céu é o limite e você, truta, é imbatível

Que o tempo ruim vai passar, é só uma fase

E o sofrimento alimenta mais a sua coragem

(Racionais MC's)

*Dedico ao meu filho **Nicolas Davi** e a
minha mãe **Maria José** que são a
minha base e também a toda a
minha família com muito
amor e carinho.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial à minha orientadora e amiga Dra. Luciana Retz de Carvalho, por ter me aceitado como seu aluno e por ter me proporcionado todo o ensinamento com o seu vasto conhecimento, atenção e afeto, nunca me deixando sem uma palavra de conforto.

À Dra. Nair Sumie Yokoia, pela amizade e por disponibilizar a macroalga para que eu desenvolvesse o estudo no laboratório de química no Núcleo de Pesquisa em Ficologia e também por ter dado a oportunidade de ter realizado o estágio na região antártica durante a Operantar XXXVI.

Ao Dr. Pio Colepicolo, Dra. Erika Mattos Stein e a Aline Paternostro Martins, do Instituto de Química (IQ) da Universidade de São Paulo (USP) por toda amizade e colaboração nas análises realizadas.

Aos mestres César Bertagia Pasqualetti, Beatriz Brunelli de Souza por toda a amizade e toda a ajuda prestada nos experimentos.

À Angélica Nunes Garcia e Víctor França Silva, por todo apoio, contribuição e principalmente pela amizade, conselhos e conversas descontraídas.

Aos meus colegas e ex-colegas do Núcleo de Pesquisa em Ficologia e do Instituto de Botânica Wilson Lopes, Julia Duque, Brenda Aparecida, Valdirene Marida dos Santos, Jonathan Martinez Canuto, Neide Souza, Andréa Dias, João Alexandre Saviolo Osti, Daniella Harumi Chen, Tiago Rodrigues, Thais Cahu, Luanda, Iris, Marina, Liliane, Gustavo Rodrigues, Leandro Almeida, Dimas Marchi Do Carmo, Marina Brito, Luiz Antonio, Ramos, Gabriel Franco, Natali Bento, Beatriz Ribeiro, Cinthia Diniz, Mayara Resende, Fernanda, Camila Lorenci e Carol por todo apreço, auxílio e convivência.

Aos meus colegas de acampamento Leandro da Costa, Eduardo de Oliveira, Marcella Amaral, Luiz Cláudio Sant'Anna pela amizade e convivência na expedição antártica durante a Operantar XXXVI.

Às pesquisadoras do Núcleo de Pesquisa em Ficologia do Instituto de Botânica de São Paulo, Dra. Andréa Tucci, Dra. Célia Leite SantAnna, Dra. Mutue Toyota Fujii, Dra. Silvia Maria Pitta B. Guimarães, pela ajuda e convivência.

Aos meus familiares e colegas, que sempre estiveram ao meu lado, pela paciência, força e palavras de carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e ao Programa Antártico Brasileiro, pelo auxílio financeiro e apoio para a viagem de coleta de material biológico na Antártica.

À Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa através do Programa de Pós-graduação do Instituto de Botânica.

Ao Instituto de Botânica de São Paulo, por fornecer a infraestrutura necessária à realização deste trabalho.

Peço sinceras desculpas às pessoas que por esquecimento, não mencionei, mas estiveram ao meu lado e contribuíram direta ou indiretamente com este projeto sempre me apoiando, com uma palavra encorajadora e torcendo para que tudo desse certo!

Muito Obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Algas.....	1
1.2 Macroalgas pardas (Ochrophyta)	2
1.3 Ordem Desmarestiales.....	6
1.4 Desmarestia menziesii.....	6
1.5 Antártica	8
1.6 Macroalgas antárticas	9
1.7 Metabolitos especiais	15
2. JUSTIFICATIVA	18
3. OBJETIVOS	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Fluxograma	19
4.2 O organismo.....	25
4.3 Obtenção dos extratos algáceos.....	25
4.4 Estudos químicos	25
4.4.1 Estudo químico do extrato em hexano, por CG/EM	25
4.4.2 Estudo químico do extrato em diclorometano	26
4.4.3 Estudo químico do extrato em acetato de etila	27
4.4.4 Estudo químico do extrato metanólico.....	27

4.5 Análise das frações e subfrações resultantes do fracionamento dos extratos ED, EAE, EME e EA da <i>Desmarestia menziesii</i>, por Cromatografia Planar, para pesquisa de metabolitos pertencentes às classes químicas dos aminoácidos e terpenoides.....	28
4.5.1 Ninidrina, para a pesquisa cromatográfica de aminoácidos micosporinas (Waksmundzka-Hajnos et al. 2008).....	28
4.5.2 p-hidroxibenzaldeído, para a pesquisa cromatográfica de terpenos (Stevens, 1964) ...	28
4.5.3 Vanilina, para a pesquisa cromatográfica de aminoácidos especiais e aminas (Grupo N-H) (Merck 1971a)	29
4.5.4 Sulfato cérico (Merck 1971b)	29
4.5.5 Cloreto férrico (Merck 1971c)	29
4.6 Extração e dosagem de pigmentos fotossintetizantes	30
4.7 Extração e dosagem de proteínas solúveis totais	30
4.8. Carboidratos solúveis	30
4.8.1 Extração dos Carboidratos solúveis	30
4.8.2 Análise quantitativa dos Carboidratos solúveis	31
4.9 Equipamentos utilizados para a análise do extrato (EH) e das frações e subfrações resultantes do fracionamento dos extratos ED, EAE e EME da <i>Desmarestia menziesii</i>, por Cromatografia Planar, para identificação e caracterização por: CG/EM, RMN e IV.	31
4.9.1 CG/EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa).....	31
4.9.2 RMN (Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear)	32
4.9.3 IV (Espectroscopia de infravermelho)	32
4.9.4 Informações sobre o cromatógrafo líquido/ espectômetro de massas (LC-MS) usado para a amostra manitol (A).	32
4.10 Estudos biológicos.....	32
4.10.1 Ensaio in vitro.....	32
4.10.1.1 Ensaio bioautográfico para análise de potencial antifúngico dos extratos obtidos de <i>Desmarestia menziesii</i> (Agripino et al. 2004)	32
4.10.1.2 Ensaio bioautográfico para avaliação da atividade antioxidante dos extratos de <i>Desmarestia menziesii</i> (Hostetmann et al. 2003).....	33
4.10.1.3 Ensaio bioautográfico para avaliação de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, frente aos extratos de <i>Desmarestia menziesii</i> (Rhee et al. 2001, Marston et al. 2002).....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Obtenção dos extratos algáceos.....	35
5.2 Avaliação de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase	35
5.3 Estudo químico dos extratos, EH, ED, EAE, EM.....	36
5.3.1 Estudo químico do extrato hexânico	36

5.3.2. Estudo químico do extrato em diclorometano	43
5.3.2.1. Estudo das frações reunidas D-VI 26-42 (3,8 mg).	43
5.3.3 Estudo químico do extrato em acetato de etila.	58
5.3.4 Estudo químico do extrato em metanol.	60
5.3.4.1. Determinação de estrutura de substância isolada.	60
5.3.4.2. Determinação da estrutura e caracterização do manitol.....	61
5.4 Pigmentos fotossintetizantes.....	66
5.5 Proteínas solúveis totais.....	68
5.6 Carboidratos Totais.....	69
6 CONCLUSÃO	71
7 REFERÊNCIAS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas de alguns florotaninos presente em algas pardas (A) Floroglucinol, (B) ecol, (C) 8,8'biecol, (D) fucofuroecol-A, (E) 7-floroecol, (F) dioxinodehydroecol, (G) florofucofuroecol-A, (H) diecol.	5
Figura 2. Fotografia da espécie <i>D. menziesii</i> (A) ambiente antártico (B) Exiscata	7
Figura 3. Estruturas de algumas MAAs presentes em algas.	14
Figura 4. Estruturas de substancias identificadas em macroalgas antárticas.	15
Figura 5. Estruturas de substâncias encontradas em espécies do gênero <i>Desmarestia</i>	17
Figura 6. Bioautogramas para detecção da atividade anticolinesterásica dos extratos a) em diclorometano, b) em acetato de etila e c) metanólico.	35
Figura 7. Cromatograma obtido do extrato hexânico de <i>D. menziesii</i> , por CG/EM, em coluna ZBWax.	36
Figura 8. Espectro de massas do fucosterol, obtido por análise em CG/EM do extrato hexânico de <i>D. menziesii</i> . (superior) em coluna ZBWax e espectro de padrão fornecido pela Biblioteca NIST.	36
Figura 9. Estruturas das substancias identificadas no extrato em hexânico após analise por CG-EM.	38
Figura 10. Cromatograma obtido do extrato hexânico de <i>D. menziesii</i> por CG/EM, em coluna HP-5MS.	38
Figura 11. Cromatograma das frações D-VI 26-42, desenvolvido com a fase móvel - Hex/AEt 85:15 v/v e derivatizado com p-hidroxibenzaldeído.	43
Figura 12. Cromatograma da reunião das frações D-VI 26-42, após analise por CG-EM, em coluna HP-5MS.	43
Figura 13. Cromatogramas das frações D-IV 1-31 e 32- 47, desenvolvidos com a fase móvel - AcOEt/MeOH 99:1 v/v, observados sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 nm e 366 nm.	58
Figura 14. Bioautogramas do extrato bruto e das frações D-VIII 23 - 27 e 28 - 33 [eluidas de CL de Sephadex-LH-20], desenvolvidos com a fase móvel – AcOEt/MeOH 99:1 v/v, em que são visíveis os halos brancos de inibição do fungo <i>Cladosporium cladosporioides</i>	59
Figura 15. Espectros (superpostos) de RMN de ¹ H das frações D-IV 1-31 e D-IV 32- 47 (500 MHz, CDCl ₃).	60
Figura 16. Espectro de Ressonância Nuclear Magnética de ¹ H das frações reunidas D-MeOH -X- 9-16 (500 MHz, MeOD).	60

Figura 17. Espectro de Ressonância Nuclear Magnética de ^1H das frações reunidas D-MeOH-X- 52-53 (500 MHz, MeOD).	61
Figura 18. Espectro de Ressonância Nuclear Magnética de ^1H das frações reunidas D-MeOH-XI- 41-49 (500 MHz, MeOD).	61
Figura 19. Espectro de Infravermelho da substância (A).	62
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H da substância (A) (H_2O) (500 MHz, CDCl_3).	63
Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C da substância (A) (125 MHz, CDCl_3).	63
Figura 22. Espectro de HSQC da substância (A).	64
Figura 23. Espectro de massas da substância (A)	65
Figura 24. Estrutura do manitol (A).	65
Figura 25. Concentração dos pigmentos fotossintetizantes Cla (A), Clc (B) e Fucoxantina (C) de <i>Desmarestia menziesii</i> nas em diferentes regiões do talo. Os valores correspondem à média \pm DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferente entre si, segundo o teste de comparação de múltipla de Student - Newman – Keuls ($p < 0,05$).	67
Figura 26. Concentração de proteínas solúveis totais de <i>Desmarestia menziesii</i> das regiões estipe, mediana e ápice. Média \pm DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferente entre si, segundo o teste de comparação de múltipla de Student - Newman – Keuls ($p < 0,05$).	68
Figura 27. Concentração de carboidratos solúveis totais do extrato aquoso (A) e etanólico (B) juntos das regiões estipe, mediana e ápice. Média \pm DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferente entre si, segundo o teste de comparação de múltipla de Student - Newman – Keuls ($p < 0,05$).	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Extratos e fases móveis utilizados.	33
Tabela 2. Massas do material algáceo liofilizado, dos extratos obtidos e seus respectivos rendimentos.	35
Tabela 3. Substâncias detectadas no extrato hexânico de <i>Desmaretia menziesii</i> , por CG/EM.	37
Tabela 4. Substâncias (metabólitos e poluentes) identificadas por CG-EM do extrato em hexânico. ..	39
Tabela 5. Substâncias (metabólitos e poluentes) identificadas por CG-EM nas frações reunidas D-VI 26-42 (provenientes do extrato em diclorometano.	46
Tabela 6. Absorções na região do infravermelho, características de grupos funcionais** e absorções observadas no espectro do cristal isolado do extrato metanólico de <i>Desmaretia menziesii</i>	62
Tabela 7. Coeficiente de Pearson (r) entre os metabólitos estudados (Cl a = Clorofila a; Cl c = Clorofila c; Fuc = Fucoxantina; Prot = Proteína; EA = Carboidrato extrato aquoso; EE = Carboidrato extrato etanólico). A correlação significativa positiva está representada em vermelho (sendo $p < 0,05$).	70

LISTA DE ABREVIATURAS

BDA:	Batata, Dextrose e Ágar
CG/EM:	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
CL:	Cromatografia líquida em coluna
Cl a:	Clorofila a
Cl c:	Clorofila c
CP:	Cromatografia planar
DPPH:	1,1-difenil-2-picrilhidrazila
EA:	Carboidrato extrato aquoso
EAE:	Extrato em acetato de etila
ED:	Extrato em diclorometano
EE:	Carboidrato extrato etanólico
EH:	Extrato hexânico
HEX:	Hexano
EME:	Extrato metanólico
Fuc:	Fucoxantina
ME:	Metanol
Prot:	Proteína
RMN de ^1H e de ^{13}C :	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono
O-H:	Hidroxila
UV:	Radiação Ultravioleta
UVA:	Radiação Ultravioleta (315–400 nm)
UVB:	Radiação Ultravioleta (280–315 nm)

Resumo

A região antártica, um dos últimos continentes desbravados pelo homem, é uma região com peculiaridades únicas, pois é um dos locais mais frios, ventosos e secos do planeta; também possui fotoperíodo muito variável e altos níveis de radiação ultravioleta. Essas condições extremas determinam estratégias de defesa nos organismos que lá vivem. Nessa região, a flora terrestre é particularmente pobre, porém a flora marinha é abundante pois há vultuosa oferta de nutrientes. Nesse ambiente marinho, as algas estão presentes como fonte primária para a cadeia alimentar e também formando um grande dossel aquático, onde predominam as macroalgas pardas. Neste meio extremo, os organismos desenvolvem mecanismos únicos de sobrevivência que podem envolver a morfologia, a anatomia, a fisiologia e a produção de compostos químicos. As algas da Antártica diferem das que habitam outras regiões principalmente pela grande eficiência de seus aparatos fotossintéticos e pela capacidade de sintetizar grandes quantidades de substâncias fotoprotetoras, além de metabolitos anticongelantes e com ações anti-herbivoria, anti-epifitismo e anti-incrustação. Esses compostos ativos são alvo de interesse pelas aplicações práticas que possuem, porém não são numerosos os estudos que descrevem o perfil químico das espécies desse ecossistema. Assim, nosso objeto de estudo é a macroalga parda endêmica *Desmarestia menziessi* J.Agardh (Ochrophyta), também componente do grande dossel marinho. Portanto, o objetivo desse trabalho foi o estudo químico e biológico dos extratos hexânico, em diclorometano, em acetato de etila e metanólico da macroalga marinha bentônica *Desmarestia menziesii*. Os exemplares foram coletados na Ilha Pinguim em 08/01/2015 e na Ilha Livingston em 12/01/2016, localizadas na Península Antártica. A biomassa coletada na ilha Pinguim foi liofilizada, moída e submetida à extração com a série de solventes em polaridade crescente hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, dando origem aos extratos EH, ED, EAE e EME, respectivamente. O EH foi submetido à cromatografia gasosa/espectrometria de massas (CG/EM); os outros extratos foram submetidos a fracionamentos cromatográficos em coluna aberta, monitoradas por cromatografia planar (CP), em que os derivatizantes foram vanilina, p-hidroxibenzaldeído, sulfato cérico, cloreto férrico, ninidrina e 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DDPH). Uma das frações do ED também foi submetida a estudos por CG/EM. Os extratos e algumas de suas frações foram submetidas aos ensaios bioautográficos anticolinesterásico e antifúngico. As substâncias isoladas foram submetidas à EM e à Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e Carbono (RMN ^1H e de ^{13}C). Já no material coletado da ilha de Livingston foram dosados os teores dos pigmentos fotossintéticos,

proteínas solúveis totais e carboidratos, em três regiões do talo: estipe, mediana e ápice. No EH, foram identificados o fucosterol, esterol comum às algas pardas, numerosos hidrocarbonetos e ácidos graxos comuns a estes organismos, além de diversas substâncias contaminantes. No ED, foram identificados hidrocarbonetos de petróleo, xenobióticos identificados pela primeira vez em algas da Antártica, além de ftalatos e adipato, que são resíduos de plásticos. No EAE foram separadas frações que apresentaram atividades antioxidante e antifúngica e cujos espectros têm feição semelhante aos dos cromenóis, já isolados dessa espécie. O EME forneceu um cristal identificado por espectros de infravermelho (IV), EM e RMN ^1H e de ^{13}C como o manitol, considerado material de reserva das algas e isolado pela primeira vez de *Desmarestia menziessi*. A quantidade com que foi encontrado no talo, a propriedade de armazenar energia térmica e o baixo ponto de congelamento levam à hipótese de que também pode exercer atividade anticongelante na alga, função que desempenha em insetos e em plantas de regiões muito frias. As análises dos teores de pigmentos fotossintetizantes mostraram que estes estão distribuídos uniformemente ao longo do talo. Também foram observadas correlações diretamente proporcionais entre as clorofila **a** e clorofila **c**. Quanto às dosagens das proteínas solúveis totais, o teor apresentado pelo ápice foi menor do que os do estipe e da mediana, que têm valores semelhantes; essa diferença pode ser atribuída ao padrão de crescimento da espécie (crescimento tricotálico). Os carboidratos também apresentaram distribuição uniforme ao longo do talo. No presente trabalho apresentamos, além de contribuições sobre alguns constituintes químicos de *D. menziessi*, uma expressiva lista de contaminantes desorvidos do talo da alga pelos solventes hexano e diclorometano e também uma breve discussão do papel das macroalgas como bioindicadoras de poluição.

Palavras-chave: Algas extremófilas, Manitol, Anticongelante.

ABSTRACT

The Antarctic region, one of the last continents colonized by man, is a unique region, since it is one of the coldest, windiest and driest places on the planet; also has a very variable photoperiod and high levels of ultraviolet radiation. These extreme conditions determine defense strategies in organisms, which live there. In this region, the terrestrial flora is particularly poor but the marine flora is abundant since there is an high nutrient offer. In this marine environment, algae are present as a primary source for the food chain and forming a large aquatic canopy, where brown macroalgae predominate. In this extreme environment, organisms develop unique mechanisms of survival that may involve the morphology, anatomy, physiology, and production of chemical compounds. Antarctic algae differ from those of other regions mainly due to the high efficiency of their photosynthetic mechanisms, and for the ability to synthesize large amounts of photoprotective substances in addition to antifreeze, anti-herbivory, anti-epiphytic, and anti-incrustation metabolites. These active compounds are target of interest due to their practical applications however, the studies which describe the chemical profile of this ecosystem species of are scarce. Thus, our object of study is the brown macroalgae *Desmarestia menziessi* J.Agardh (Ochrophyta), endemic in the region and component of the large marine canopy. Therefore, our aim was the chemical and biological study of hexane, dichloromethane, ethyl acetate and methanol extracts from this marine macroalga. The specimens were collected on Penguin (62° 6'0"S, 57°56'0"W) and Livingston (62° 38'52. 7"S, 60° 45' 49.8" W) Islands, located in the Antarctic Peninsula, on 1/8/2015 and 1/12/2016. The biomass collected on Penguin Island was lyophilized, ground (603 g) and sequentially extracted with *a series of solvents* of increasing polarity viz., hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and methanol, process that gave rise to the extracts EH, ED, EAC e EM, respectively. EH was subjected to gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS); the other extracts were submitted to open column chromatographic fractionation monitored by planar chromatography (PC), and *revealed with vanillin, p-hydroxybenzaldehyde, ceric sulfate, ferric chloride, ninhydrin, and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DDPH)*. One of the fractions of ED was studied by GC/MS, as well. All extracts and some of its fractions were submitted to anticholinesterase and antifungal bioautographic tests. The isolated compounds were identified by Nuclear Magnetic Resonance of Hydrogen and Carbon (NMR ¹H and ¹³C), and MS. The contents of photosynthetic pigments, total soluble proteins and carbohydrate of three regions of tallus (stipe, median and apex) were measured in the material collected from the Livingston Island. Fucosterol, sterol common to brown algae, numerous hydrocarbons and fatty acids, and various contaminants as

well were identified in EH. Petroleum hydrocarbons, xenobiotics identified for the first time in Antarctic algae, as well as phthalates and adipate that are plastic waste, were detected in ED. Fractions that presented antioxidant and antifungal activities and whose spectra have a similar appearance to the chromenols, already isolated from this species, were separated from EAC. A compound was isolated as a crystal from EM; its structure was established by elucidation of the Infrared, ^1H and ^{13}C NMR, and MS spectra. This compound, mannitol, is considered reserve material of algae, was isolated in great quantity and for the first time from *D. menziessi*; besides, it has low freezing point and the can storage thermal energy, properties which leads one to suppose that it exerts antifreeze activity on algae. Mannitol performs this function on insects and plants from very cold regions. The analyses of the photosynthetic pigment contents showed that they are distributed evenly over the tallus. Correlations directly proportional between chlorophyll **a** and chlorophyll **c** were observed, as well. In the dosages of total soluble proteins, the apex presented higher content than the stipe and the median, which have similar contents; this difference can be attributed to the growth pattern of the species. Carbohydrates also showed uniform distribution over the thallus. Herein, we present, in addition to contributions on some chemical constituents of *D. menziessi*, an expressive list of pollutants desorbed from the tallus of *D. menziessi*, by the solvents hexane and dichloromethane and a brief discussion on the role of macroalgae as pollution bioindicators.

Key-words: Extremophile algae, Mannitol, Antifreeze.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Algas

As estimativas do número de componentes do grupo heterogêneo de organismos denominados “algas” variam de 36.000 a 10 milhões de espécies que pertencem a várias linhagens evolutivas; por esse motivo, apresentam grandes variações quanto à forma, tamanho, metabolismo e estruturas celulares. Podem ser unicelulares ou possuir talos gigantes, como os kelps, produzir alcaloides, terpenos e aminoácidos os mais diversos, assim como uma expressiva variedade de polímeros de açúcar e de pigmentos fotossintéticos e também acumular seus materiais de reserva em diferentes macromoléculas (Graham et al., 2009; Marques, 2015).

São, majoritariamente, espécies fotossintéticas que produzem oxigênio; habitam, comumente, os ambientes aquáticos, porém são encontradas também nos terrestres, mesmo os mais extremos como os solos de desertos, a neve de montanhas e as fontes termais; podem se associar aos fungos formando os líquens (Graham et al., 2009; Marques, 2015).

Esses organismos devem sua importância ao fato de gerarem 50% do oxigênio presente na atmosfera terrestre e de atuarem no ciclo biogeoquímico de muitos elementos, como nos do carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre (Graham et al., 2009). Além disso, são considerados a base da cadeia alimentar de todos os sistemas aquáticos, pois moluscos, equinodermas, crustáceos e peixes em diferentes estágios de crescimento deles se alimentam. Também possuem relações de simbiose com bactérias e outros protistas, fungos, animais e plantas; por vezes, podem ser considerados parasitas e/ou patógenos para muitos outros organismos, inclusive humanos (Graham et al., 2009; Marques, 2015).

Multiplicam-se tanto por reprodução assexuada quanto por sexuada, sendo que a primeira ocorre em populações de numerosas espécies unicelulares, pela simples divisão celular longitudinal ou transversal de corpos celulares conhecidos como zoósporos (unicelulares flagelados), aplanósporos ou autósporos (não flagelados).

Já a reprodução sexuada envolve a produção e a fusão do gameta e a produção e o desenvolvimento do zigoto, na alga. Existem três tipos de fusão gamética: a isogâmica (gametas iguais), a anisogâmica (em que o gameta feminino é maior do que o masculino, sendo ambos flagelados) e a oogâmica (em que o gameta feminino, desprovido de flagelo é maior do que o gameta masculino, flagelado). Foram observados três tipos principais de ciclos de vida sexual e eles diferem entre si principalmente pelo ponto em que ocorre a meiose e pelo número de estádios de vida multicelulares observados durante o processo.

Dessas diferenças advêm as denominações de meiose zigótica, gamética ou esporica (Graham et al., 2009).

As algas, para se adaptarem a determinados fatores abióticos e bióticos existentes no ambiente em que vivem, sintetizam numerosas substâncias, muitas das quais são portadoras de interessantes atividades biológicas e outras tantas, empregadas em setores diversos da indústria.

Especificamente quanto às macroalgas marinhas, grupo em que está situado o organismo que é nosso objeto de estudo, elas são fotossintetizantes, não vasculares e eucarióticas e o comprimento de seus talos pode variar de apenas poucos milímetros a 60 m de comprimento (Coppejans et al., 2009). Estão subdivididas em três grandes taxa, segundo a pigmentação de seus talos: Chlorophyceae (algas verdes), Ochrophyta (algas pardas) e Rhodophyceae (algas vermelhas) (Kharkwal et al., 2012). Os pigmentos que determinam a coloração das algas verdes são os α -, β - e γ -caroteno, as clorofilas a e b, a luteína, a sifonoxantina e a sifoneína; os das algas pardas são as clorofilas *a*, *c1* e *c2*, o β -caroteno, violaxantina e a fucoxantina e os das vermelhas, a clorofila *a*, a r-ficocianina, a aloficocianina, a c-ficoeritrina e os α - e β -carotenos (Sharma, 2011).

Seus principais metabolitos primários são proteínas, peptídeos, polissacarídeos, aminoácidos, lecitinas e ficobiliproteínas; seus metabolitos secundários são terpenos, acetogeninas, alcaloides e polifenóis, os quais possuem estruturas bastante diversificadas e apresentam um leque de atividades extremamente abrangente (Blunt et al., 2014, 2013 e revisões anteriores).

1.2 Macroalgas pardas (Ochrophyta)

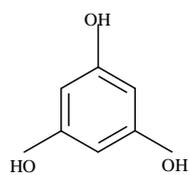
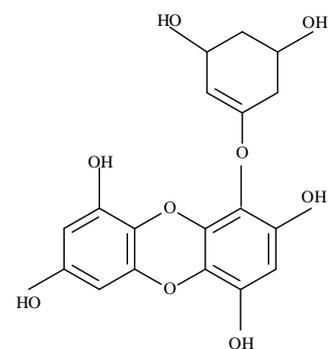
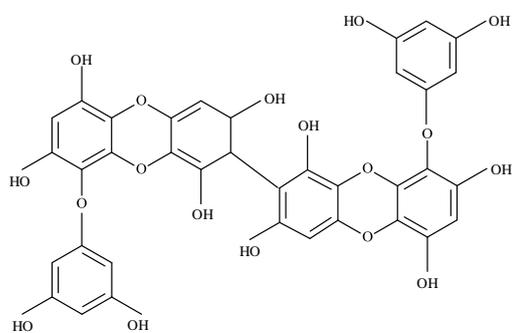
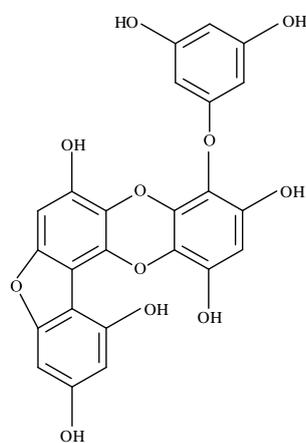
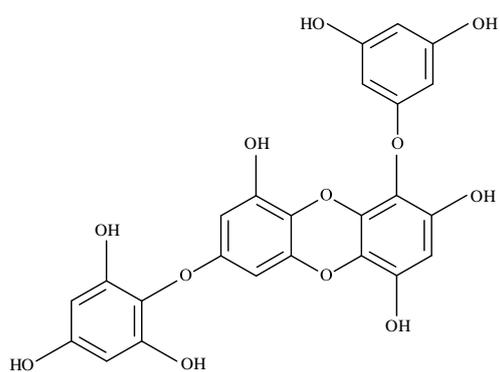
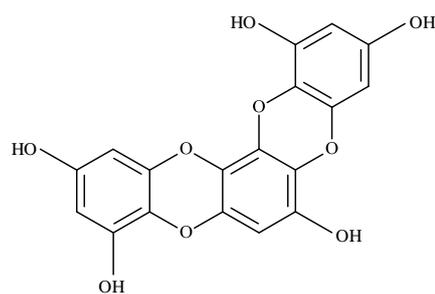
O grupo das macroalgas pardas é composto por mais de 250 gêneros e mais de 1500 espécies (Graham et al., 2009) e podem ser anuais ou perenes (Graham, & Wilcox, 2000). Habitam predominantemente o ambiente marinho e são encontradas nas zonas do supra, meso e infralitoral, especialmente nas regiões polar, boreal e temperada. Existem quatro gêneros de pardas de água doce: *Heribaudiella*, *Pleurocladia*, *Bodanella* e *Sphacelaria* (Lee, 2008).

O tamanho de seus talos varia de microscópicos a gigantescos (kelps) e podem ser filamentosos, pseudoparenquimatosos e parenquimatosos; o filamentoso é constituído por filamentos individuais ou por agregados de filamentos, para dar robustez ao corpo. O pseudoparenquimatoso é composto por filamentos agregados, porém sem tecidos verdadeiros. Já o parenquimatoso se desenvolve por divisão celular em vários planos. Apresentam crescimento tricotático, difuso, apical e intercalar (Graham & Wilcox, 2000).

Nelas, a parede celular é composta por duas camadas de celulose, material que constitui o esqueleto estrutural principal (Lee, 2008), ácido algínico (um polímero dos ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos com ligações 1-4.), fucanos (polissacarídeos sulfatados) e sais de Na^+ , K^+ , Mg^+ e Ca^{2+} ; estas substâncias conferem suporte estrutural, flexibilidade e proteção contra agentes externos (Graham & Wilcox, 2000).

Seus pigmentos fotossintéticos são a clorofila a, c1 e c2, o β -caroteno, violoxantina e a fucoxantina sendo este último o responsável por conferir à alga, a cor marrom (Sharma, 2011). Seus materiais de reserva são a laminarina, um polissacarídeo com ligações β -1,3 – glucanas, que é solúvel em água (Gupta & Abu-Ghannam, 2011) e o manitol, um poliálcool constituído por uma cadeia aberta de seis carbonos, que representa de 20-30% do peso seco das algas marrons (Graham & Wilcox, 2000). Foi observado que, em determinadas algas deste grupo, a concentração do manitol aumenta ou diminui em relação diretamente proporcional com o aumento ou a diminuição da salinidade do meio, e que este mecanismo que é independente da fotossíntese protege as células da destruição nos meios hipotônicos e do encolhimento, nos meios hipertônicos (Lee, 2008).

As algas pardas produzem uma substância similar aos taninos das plantas terrestres, os florotaninos (polifenóis polares), que participam do metabolismo primário e secundário (Amsler & Fairhead, 2005); estes polifenóis são polímeros do floroglucinol (3,5-tri-hidroxibenzeno), sintetizados pela via do acetato-malonato e são subdivididos em quatro grupos principais, segundo o tipo de ligação entre seus monômeros (Figura 1): fualois/floretois (ligação éter), fucois (ligação fenil), fucofloroetois, (ligação éter e fenil), e ecois (ligação dibenzodioxina) (Sonani et al., 2017). Eles são encontrados em maior concentração em estruturas denominadas fisóides e após serem liberados para o meio, tornam-se componentes da parede celular. Aos florotaninos são atribuídas as ações anti- herbivoria (Amsler & Fairhead, 2005) e protetora, frente aos raios ultravioletas (Pavian et al., 1997).

(A)**(B)****(C)****(D)****(E)****(F)**

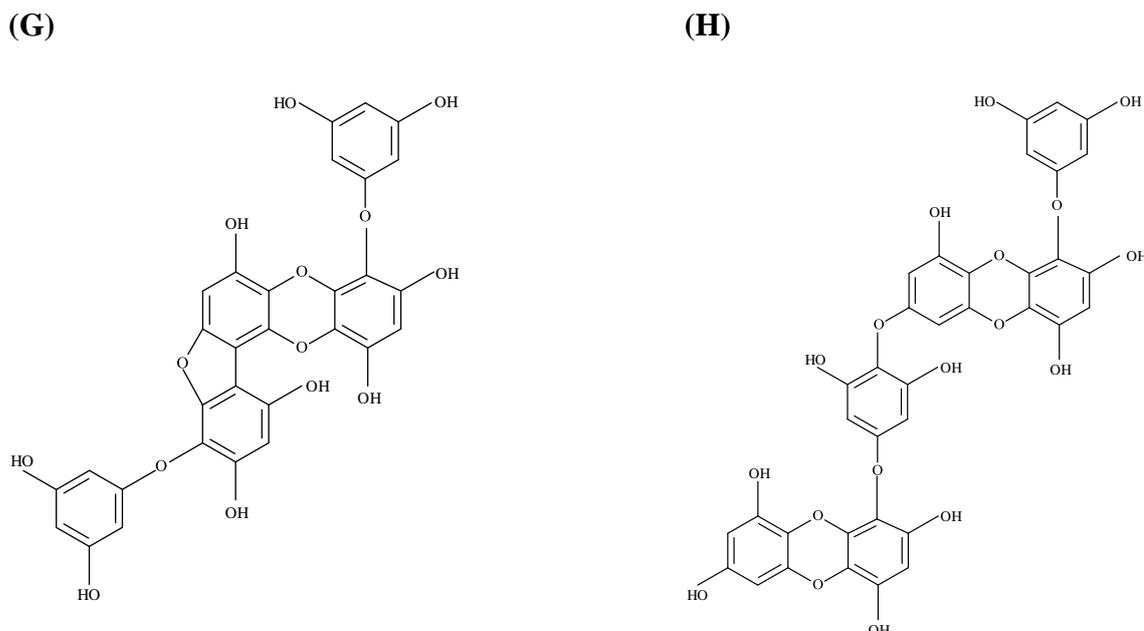


Figura 1. Estruturas de alguns florotaninos presente em algas pardas (A) Floroglucinol, (B) ecol, (C) 8,8'biecol, (D) fucofuroecol-A, (E) 7-floroecol, (F) dioxinodehydroecol, (G) florofucofuroecol-A, (H) diecol.

O ciclo de vida das algas pardas foi descrito por Guimarães et al. (2016), como segue:

“Quanto ao ciclo de vida, nas algas pardas, há alternância das gerações haploide (gametófito) e diploide (esporófito), ocorrendo a meiose para a produção de esporos haploides. Estas gerações alternantes podem ser isomórficas ou heteromórficas, com três tipos de fusão gamética: isogâmica, anisogâmica e oogâmica” (Guimarães et al., 2016).

“O histórico de vida apresenta alternância de gerações haploide (gametófito) e diploide (esporófito), em que a meiose ocorre para produção de esporos haploides. Estas gerações alternantes podem ser isomórficas ou heteromórficas. Com três tipos de fusão gamética: isogamia, anisogamia e oogamia” (Guimarães et al., 2016).

“Entre as espécies que possuem alternância de gerações heteromórficas, que são a grande maioria, o esporófito corresponde à geração mais desenvolvida (macrotales). O esporófito desenvolve estruturas uniloculares ou pluriloculares. As estruturas uniloculares produzem meiosporos (esporos haploides originados por meiose), que, ao germinarem, dão origem a geração haploide; as estruturas pluriloculares representam esporângios neutros, ou seja, que produzem esporos diploides por mitose (mitósporos), que, ao germinarem, formam novamente esporófitos diploides. O gametófito haploide desenvolve estruturas pluriloculares que representam os gametângios. A fusão dos gametas resulta na formação de um zigoto que se desenvolve em um novo esporófito” (Guimarães et al., 2016).

“Em representantes da ordem Fucales, os talos são sempre diploides; a meiose ocorre em células do interior de cavidades (conceptáculos) em ramos especializados denominados

receptáculos. Nesta ordem, acredita-se ter havido a redução muito grande da fase gametofítica, representada por poucas células haploides dentro dos conceptáculos, oriundas da meiose espórica. Estas células haploides dão origem a anterídios e oogônios, sendo os anterozoides e as oosferas liberados de dentro dos conceptáculos por um orifício” (Guimarães et al., 2016).

1.3 Ordem Desmarestiales

Nesta ordem, as algas são heteromórficas, possuem esporófitos macroscópicos cilíndricos, comprimidos e achatados que podem ser inteiros ou ramificados; o crescimento é tricotático, iniciado por filamentos individuais, com divisões intercalares bidirecionais. A estrutura resultante é pseudoparenquimatosa, com córtex desenvolvido a partir dos filamentos descritivos rizoidais, que crescem a partir das bases de pelos laterais. As células têm vários plastídios discoides e não pirenoides (Norris, 2010).

Apresentam histórico heteromórfico, com gametófitos filamentosos microscópicos; a reprodução sexual é oogâmica, sendo os zoósporos desenvolvidos a partir de esporângios uniloculares (Lee, 2008; Norris, 2010). Na região infralitoral das águas mais frias dos Hemisférios Norte e Sul, os esporófitos de *Desmarestia* podem atingir comprimento que variam de dois a três metros.

O esporófito apresenta crescimento tricotático, sendo o eixo principal corticado por células em crescimento descendente. (Lee, 2008)

Algumas das espécies de *Desmarestia* acumulam grandes quantidades de ácido málico, o que causa a redução do pH do fluido vacuolar em até 2 pontos. Nas águas antárticas, os membros de Desmarestiales constituem a maior parte da biomassa das algas bentônicas. Eles são perenes e cobrem grandes áreas, em profundidade de cerca de 40 m. As espécies maiores e mais abundantes (*Desmarestia menziesii* J.Agardh e *Desmarestia anceps* Montagne) formam florestas, sem o dossel protetor característico de muitos kelps. A Antártida possui a única flora de águas frias sem Laminariales (Lee, 2008).

1.4 *Desmarestia menziesii*

A espécie *Desmarestia menziesii* J.Agardh foi estabelecida por J.Agardh 1848 (**Figura 2**). Suas características diacríticas principais são: esporófito perene podendo chegar até 4 m de comprimento com crescimento no final do inverno e início da primavera, apresentando talo

com eixo principal com ramos opostos crescendo a partir de um pequeno apressório robusto e fibroso.

Apresenta ciclo de vida heteromórfico com a morfologia dos gametófitos filamentosos e microscópicos e os esporófitos macroscópicos consistindo de um complexo macrotalo pseudoparenquimatoso, o ciclo é sazonal ocorrendo o desenvolvimento da fase gametofítica e o desenvolvimento dos esporófitos jovens no inverno. Durante o inverno, gametófitos e esporófitos possuem alta eficiência fotossintética por demanda de pouca luz ($2,3$ a $2,5 \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) o que fazem ter sucesso. Crescendo sobre rochas na região entremarés e de ambientes calmos em profundidades de 15 m, mas podendo chegar a crescer em profundidade de 60 m a 80 m. Como mencionado acima, ao lado de *Desmarestia anceps* e também de *Himantothallus grandifolius* (A Gepp & ES Gepp) Zinova formam um grande dossel no ambiente aquático antártico.

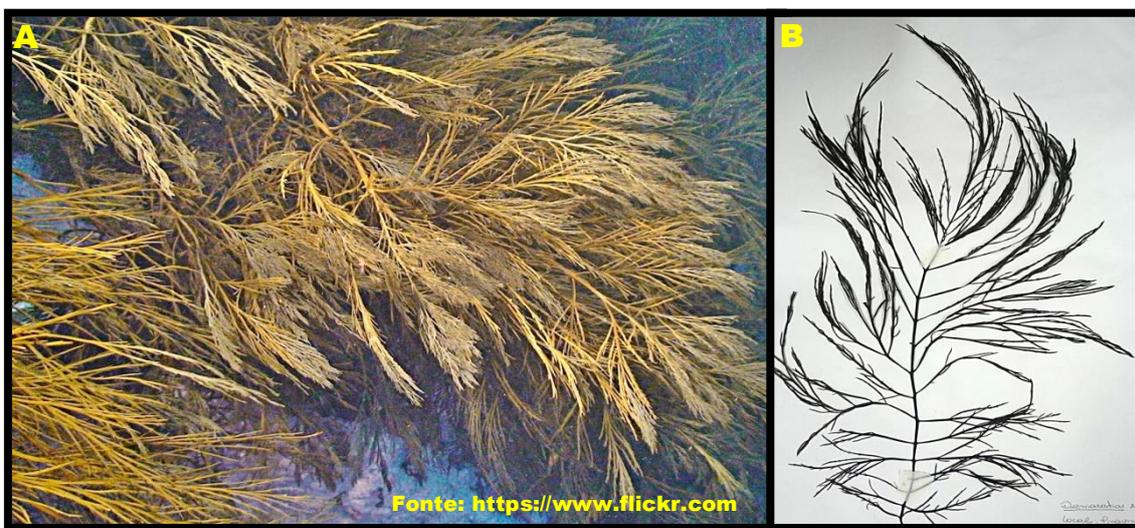


Figura 2. Fotografia da espécie *D. menziesii* (A) ambiente antártico (B) Exsiccata

Esta espécie é encontrada nas ilhas Antárticas e Subantárticas, Ilha de Anvers, Mar de Ross, Geórgia do Sul, Ilhas Shetland do Sul, Terra Adélia, Ilha Trindade e Terra de Wilkes (Schories & Kohlberg 2016; Fujii et al., 2014; Gómez & Wiencke 1997, 1996; Wiencke et al., 1995).

1.5 Antártica

A Antártica é protegida pelo tratado antártico, pelo qual esse continente não é possessão exclusiva de nenhum país, mas sim, uma reserva natural, consagrada a paz e à ciência. Atualmente são consideradas “Antártica” todas as regiões que estão acima da latitude 60° Sul (Marinha do Brasil, 2016; Pasqualetti, 2015; Ministério do Meio Ambiente, 2009).

Localizado no polo sul, o continente antártico tem cerca de 14 milhões de km², porém, no inverno, devido ao congelamento dos mares e do acúmulo de neve precipitada, seu território alcança quase 20 milhões de km² (Felicio, 2007); sua posição geográfica atual foi atingida há cerca de 45 milhões de anos e seu isolamento dos outros continentes ocorreu há cerca de 30 milhões de anos, quando a Península Antártica separou-se da América do Sul (Bargagli, 2008).

Este continente perenemente coberto de gelo é circundado pelo Oceano Austral (Zacher et al., 2009); a Corrente Circumpolar Antártica e o vórtice ciclônico circumpolar isolam termicamente as águas desse Oceano ao redor do continente, mantendo sua temperatura baixa há pelo menos 14 milhões de anos, ou seja, desde a primeira glaciação da Antártica (Zacher et al., 2009). Tanto a Corrente Circumpolar Antártica quanto o vórtice ciclônico circumpolar, que são consequência da abertura e do aprofundamento da Passagem de Drake, aumentaram o isolamento do continente e contribuíram para seu resfriamento (Bargagli, 2008).

A frente polar antártica (ou a Convergência Antártica) delimita o Oceano Austral pelo norte (Zacher et al., 2009).

Cerca de 95% desse continente apresenta-se congelado, ou seja, 80% da água doce do planeta está ali armazenada. É uma região de características únicas e ali habitam organismos extremamente adaptados. No continente, a temperatura varia entre -16 °C e -89 °C e nas ilhas próximas à península, entre 5 °C e -25 °C (Felicio, 2007); é um ambiente seco, em que a velocidade média anual do vento é de 20 m².s⁻¹ (Parish & Bromwich, 1991).

O fotoperíodo é definido pelas estações do inverno e do verão, sendo de 5h de claridade no inverno e de 20h de claridade, no verão (Wiencke, 1990). O continente está situado sob uma falha na camada de ozônio, (Bargagli, 2008); por isso, os níveis de radiação ultravioleta na região são muito altos (Wiencke, 1996).

Com relação ao ambiente marinho, este difere consideravelmente do terrestre com relação a diversos fatores abióticos: por exemplo, a temperatura média da água é de -1,8 °C, no inverno e de +2 °C, no verão (Wiencke, 1989). Também, com relação a oferta de nutrientes, ou seja de condições para a manutenção da vida, o oceano mostra-se um ambiente

bem menos inóspito: a zona de ressurgência observada entre a Corrente Costeira Antártica e a Corrente Circumpolar Antártica traz para superfície águas profundas ricas em nutrientes o que favorece a existência de grande diversidade de organismos (Lee, 2008; Lüning, 1990).

Os níveis de nutrientes permanecem elevados ao longo do ano, nas águas antárticas, sendo que a quantidade de Nitrato (NO_3^-) varia entre 14 e 33 μM (Peters et al., 2005) e a de Fosfato (PO_4^{3-}), entre 2,0 μM e 3,2 μM (Schloss et al., 2002), o que favorece grandemente a sobrevivência da biota aquática (Zacher et al., 2009).

Entretanto, os organismos marinhos são submetidos a oscilações nos níveis de salinidade que variam entre 7 e 102 PSU (Wiencke et al., 2007), observadas durante a formação do gelo e do degelo (Kirst & Wiencke, 1995). O pH da água varia entre 8,0 e 8,62, de acordo com a época do ano (Schoenrock et al., 2014).

A luz, que é crucial para a propagação da vida, está presente, nesse ambiente, apenas quatro meses por ano, ocasião em que promove uma grande explosão de vida, gerando um grande fluxo de nutrientes para todos os níveis da cadeia alimentar. Entretanto, a taxa de radiação incidente é muito elevada, com valores em torno de 1700 $\mu\text{mol f\otons m}^{-2} \text{s}^{-1}$, 44 W m^{-2} (UVA, 315–400 nm) e 2.3 W m^{-2} (UVB, 280–315 nm) (Zacher et al., 2009). As taxas de radiação muito altas na região são resultado da depleção da camada de ozônio que vem ocorrendo ao longo das últimas décadas, devido à ação antrópica. Níveis de radiação ultravioleta elevados são altamente mutagênicos e letais para os organismos marinhos (Karsten et al., 2009).

Todos esses fatores abióticos e bióticos enumerados, aos quais pode-se acrescentar a predação, o epifitismo e a competição fazem com que os organismos (dentre os quais destacamos as algas) que habitam a Antártica sejam extremamente ambientados ou seja, tenham desenvolvido características que possibilitam a eles fazer frente às condições desse ambiente extremo.

1.6 Macroalgas antárticas

Segundo pesquisas recentes, o número de espécies de macroalgas antárticas está entre 120 e 130 espécies (Clayton & Wiencke, 2002; Wulff et al., 2011 apud Medeiros, 2013). Essa flora é caracterizada por alto grau de endemismo, pois 33% de seus componentes são encontrados apenas nessa região (Zacher et al., 2009); entre todas, a ordem Desmarestiales sobressai por apresentar a maior proporção de espécies endêmicas (cinco espécies) e também por formar as grandes florestas de kelps, onde a espécie *Himantothallus grandifolius* destaca-se por atingir uma dezena de metros de comprimento (Medeiros, 2013).

A abundância de nutrientes do meio favorece o desenvolvimento desses organismos e a biomassa gerada desempenha um papel fundamental nos ecossistemas costeiros por contribuir para a produção primária pela produção de quantidades significativas de carbono (Gómez et al., 2009) e por servir de habitat e de fonte de alimento para uma variedade de espécies da fauna marinha, em especial peixes (e.g. “rockfish” - *Notothenia coriiceps*), equinodermas (e.g. *Odontaster validus* e *Sterechinus newemayeri*) e anfípodas (e.g. *Gondogenia antarctica*) (Medeiros, 2013).

O cabedal genético que estas algas incorporaram ao longo de suas histórias evolucionárias, e que é responsável por suas características morfológicas, bioquímicas e químicas, mostra a determinante influência do meio ambiente sobre elas. As estratégias de adaptação aos diversos fatores bióticos ou abióticos a que estiveram expostas determinaram as cores de seus pigmentos, seus ciclos de vida, sua morfologia e seus metabolitos primários e secundários.

Essa ambientação proporcionou a elas um aumento no conteúdo de seus pigmentos, necessários para a realização da fotossíntese na presença de pouca luz; daí a alta eficiência fotossintética que apresentam. Alguns desses indivíduos têm a capacidade de tolerar até 18 meses de escuridão, pois demandam muito pouca luz para se desenvolverem. Esta habilidade foi comprovada pela observação de estágios microscópicos de desenvolvimento de algas antárticas, em que o ponto de saturação de crescimento deu-se sob a irradiância de $4 - 20 \mu\text{mol fotons m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, mostrando que estão extremamente adaptadas à sombra (Wiencke & Bischof, 2012; Gómez, 2001).

Parte das espécies que lá habitam mantém o aparelho fotossintético ativo, captando toda a luz disponível; os indivíduos que não mantêm o aparelho fotossintético ativo, para sobreviver, utilizam o seu material de reserva, que é sintetizado em grandes quantidades, no período do verão (Weykam et al., 1996).

As marcadas mudanças sazonais da Antártica permitem que as algas sejam classificadas em dois grupos: o dos antecipadores e o dos respondedores de estação. Os antecipadores de estação crescem e se desenvolvem em um ritmo anual estratégico, adequado para a espécie. Compõem este grupo as algas pardas *Desmarestia menziesii*, *Desmarestia anceps*, *Himantothallus grandifolius*, *Desmarestia antarctica* R.L.Moe & P.C.Silva, *Ascoseira mirabilis* Skottsberg e as algas vermelhas *Palmaria decipiens* (Reinsch) R.W.Ricker, *Delesseria salicifolia* Reinsch, *Gymnogongrus antarcticus* Skottsberg, *Gymnogongrus turquetii* Hariot, *Hymenocladopsis crustigena* R.L.Moe, *Trematocarpus antarcticus* (Hariot) Fredericq & R.L.Moe e *Phyllophora ahnfeltioides* Skottsberg. Já as algas pertencentes ao grupo dos respondedores de estação crescem e se reproduzem quando as

condições ambientais são favoráveis. São elas: *Adenocystis utricularis* (Bory) Skottsberg (parda), *Iridaea cordata* (Turner) Bory de Saint-Vincent, *Gigartina skottsbergii* Setchell & N.L.Gardner (vermelha), *Ulva hookeriana* (Kützing) Hayden, Blomster, Maggs, P.C.Silva, M.J.Stanhope & J.R.Waaland e *Acrosiphonia arcta* (Dillwyn) Gain (verde).

Essa divisão torna-se bastante clara ao observarmos que a maioria dos indivíduos antecipadores de estação são endêmicos e ocorrem quase que exclusivamente na zona do infralitoral enquanto que os respondedores de estação estão distribuídos principalmente nas regiões temperadas adjacentes e podem crescer na zona do mesolitoral (Wiencke & Bischof, 2012; Kain, 1989).

A camada de gelo que protege as algas marinhas bentônicas do excesso de radiação solar durante a maior parte do ano desaparece no início do verão, fazendo com que esses organismos fiquem expostos a elevados níveis desta radiação (Gómez et al., 2009). Esse é outro fator importante de estresse que as algas são submetidas, uma vez que, embora a luz solar seja essencial para manutenção da vida das algas, seu excesso pode inibir muitos processos biológicos e afetar todos os componentes celulares, especialmente os cloroplastos, as mitocôndrias, o núcleo e o citoplasma (Karsten et al., 2009).

Para se protegerem dos raios ultravioletas, elas desenvolveram defesas que incluem: o aumento da espessura do talo, o que minimiza os danos que a radiação UVB pode induzir no DNA, pois as camadas celulares externas sombreiam as células internas e constituem um caminho mais longo a ser percorrido pelos raios UV e a produção de substâncias fotoprotetoras, os aminoácidos do tipo das micosporinas e os florotaninos, que desempenham funções tanto no metabolismo primário quanto no secundário (Karsten et al., 2009).

O conjunto de estratégias metabólicas desenvolvidas pelas algas para fazerem frente ao frio intenso inclui: a manutenção da fluidez das membranas biológicas, o que foi conseguido pelo aumento da proporção de ácidos graxos insaturados, com relação aos saturados, nas membranas celulares, evitando que se tornem rígidas, sendo que as macroalgas polares são ricas em ácidos graxos insaturados; as adaptações moleculares em enzimas catalizadoras dos principais processos metabólicos, para que as velocidades de reações se mantenham adequadas; as adaptações da cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos para funcionamento em temperaturas frias; o desenvolvimento das proteínas de indução de choque frio e anticongelantes (Becker et al., 2011; Gómez et al., 2009; Morgan-Kiss et al., 2006).

A sensibilidade à temperatura afeta componentes celulares tais como membranas e proteínas; as adaptações evolucionárias adotadas para fazer frente às variações térmicas incluem estratégias quantitativas (como alterações das concentrações de enzimas e / ou de reagentes), qualitativas (como o uso de uma proteína variante / isoenzima com diferentes

características térmicas) ou modulações (como a modificação do ambiente proteico para minimizar o impacto da mudança de temperatura) (Wiencke & Bischof, 2012), com relação às enzimas, uma das mais importantes estratégias é o aumento de suas concentrações, como demonstrado por Paternostro (2013) e Pasqualetti (2015), em estudos sobre *Palmaria decipiens*. Em *D. menziesii*, esse aumento do teor de enzimas, que ocorre em setembro-outubro, contribui para a síntese de compostos dos quais depende a sobrevivência dos indivíduos Gómez e Weykam (1998).

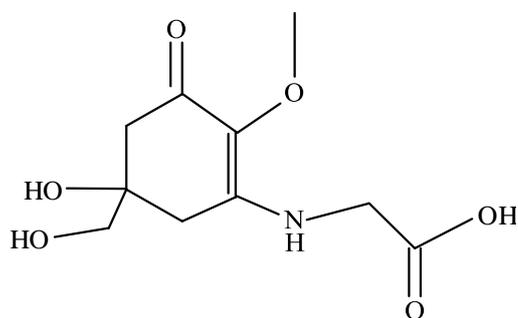
As algas da Antártica também são produtoras de substâncias com importantes atividades biológicas tais como as ações antiviral (Marinho et al., 2017) anti-inflamatória (Moles et al., 2014), antifitofágica (Núñez-Ponz & Avila, 2014), antimicrobiana e citotóxica (Martins et al., 2014; Lebar et al., 2007), anticrustante e algicida (Sevak et al., 2012). Entretanto, merecem destaque especial os já mencionadas micosporinas e florotaninos, produzidos em quantidades significativas, para proteção da radiação ultravioleta.

Os aminoácidos tipo micosporinas [do inglês mycosporine-like amino acids, (MAAs)] são compostos de baixo peso molecular, altamente polares, solúveis em água, incolores e com alto coeficiente de absorvidade molar e absorção máxima entre 309 e 362 nm. Estruturalmente, são constituídos por uma unidade ciclo-hexenona ou ciclo-hexenimina, conjugada ao nitrogênio do grupo amina de um aminoácido ou aminoálcool, (Figura 3). Esses aminoácidos exibem uma alta absorção molar das radiações UVA e UVB e são moléculas fotoquimicamente estáveis (Marques, 2015; Karsten et al., 2009). Essas substâncias estão presentes tanto em micro quanto em macroalgas. Nestas, são encontradas em alta concentração somente nas rodofíceas; não foram isoladas das algas verdes e pardas, apresentando-se como exceção a espécie *Prasiola crista* Antártica, alga verde que contém altas concentrações de desses compostos.

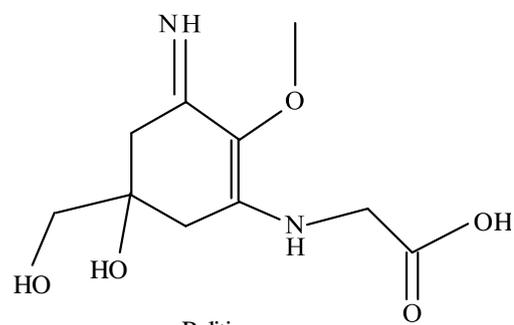
As algas vermelhas podem ser fisiologicamente classificadas em três categorias, quando se consideram as concentrações e o padrão de indução de micosporinas, após exposição a diferentes condições de radiação. São elas: tipo I- espécies sem capacidade para a biossíntese de micosporinas; tipo II- espécies com uma concentração básica de micosporinas que é ajustada em relação às mudanças na radiação ambiental; tipo III- espécies com uma composição e concentração de micosporinas relativamente alta, independentemente das condições ambientais (Hoyer et al., 2001; Hoyer et al., 2002).

A fotoproteção dessas substâncias seria assim explicada: elas agiriam como solutos de blindagem, dissipando a energia de comprimento de onda curto, absorvida em forma de calor inofensivo, sem gerar reações fotoquímicas (Bischof et al., 2007); algumas micosporinas,

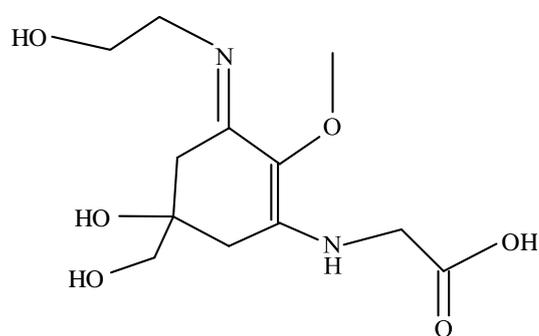
como a micosporina-glicina, apresentam atividade antioxidante moderada (Dunlap & Yamamoto, 1995).



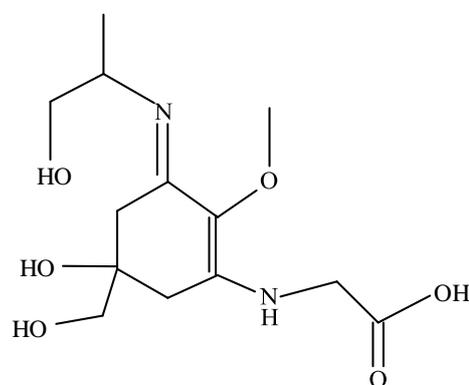
Micosporina-glicina



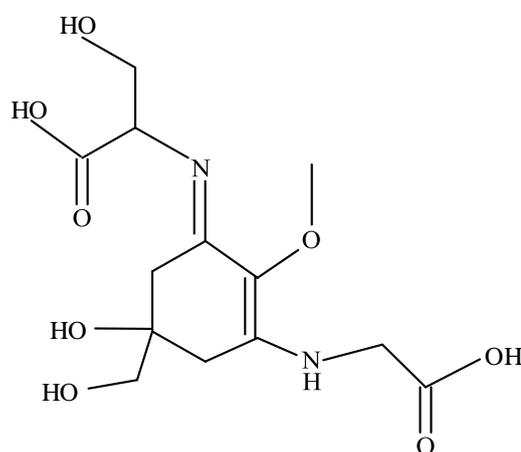
Palitina



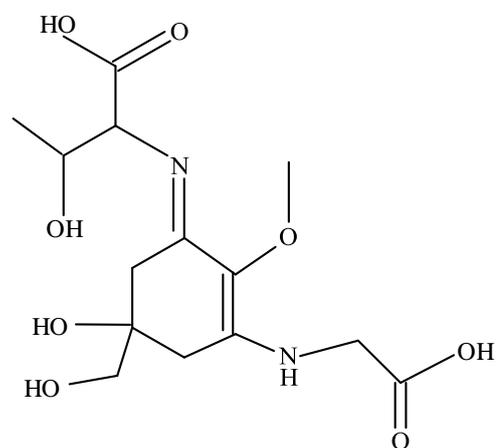
Asterina-330



Palitinol



Chinorina



Porphyra-334

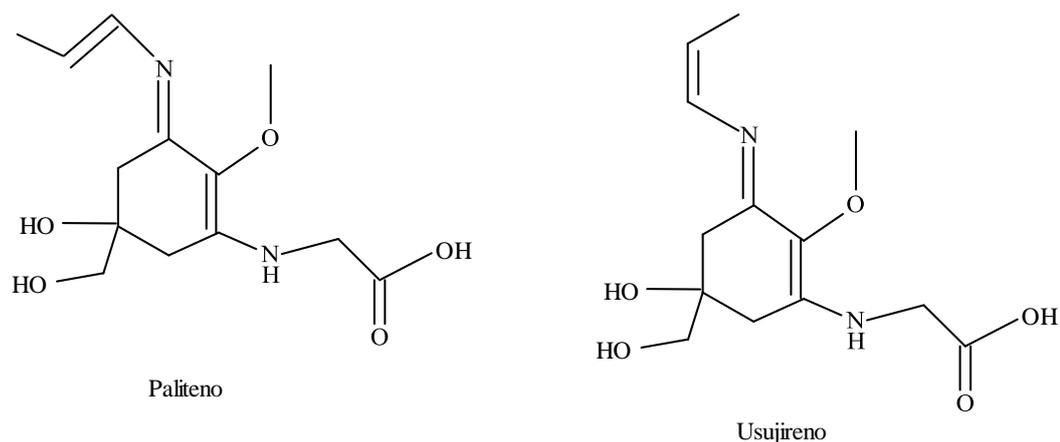


Figura 3. Estruturas de algumas MAAs presentes em algas.

Quanto aos florotaninos, são produzidos exclusivamente pelas algas pardas; nelas, desempenham funções na parede celular como no fortalecimento e na cicatrização de injúrias, protegem contra herbivoria e dos raios ultravioletas. As algas pardas da Antártica possuem concentrações de florotaninos que variam entre 0,5 e 9% do peso seco e que são relativamente altas, quando comparadas com os teores desses compostos das algas pardas das regiões tropicais e temperadas (Iken et al., 2009; Iken et al., 2007).

São raros os estudos sobre substâncias anticongelantes de macroalgas: os autores Karsten et al., (1990) apontam, como anticongelante, o propionato de dimetilsulfônio (DMSP), osmólito orgânico cujas concentrações intracelulares são ativamente ajustadas e diretamente proporcionais à salinidade externa (Karsten et al., 1996).

Foram isolados de macroalgas da Antártica e identificados a menzoquinona (de *Desmarestia menziesii*) (Ankisetty et al., 2004; Avila, Taboada, & Núñez-Pons, 2008), furanonas halogenadas dimericas (de *Delisea pulchra* (Greville) Montagne), esteroide Cistofoserol (de *Cystosphaera jacquinotii* (Montagne) Skottsberg), p-metoxifenol e 4-Hidroxibenzaldeído (de *Myriogramme smithii* (J.D.Hooker & Harvey) Kylin), (Lebar et al., 2007) os monoterpenos halogenados anverenas e epi-plocamene (de *Plocamium cartilagineum*) (Amsler et al., 2009) e o 7-ceto-estigmasterol (de *Prasiola crispa*) (Marinho et al., 2017) (Figura 4).

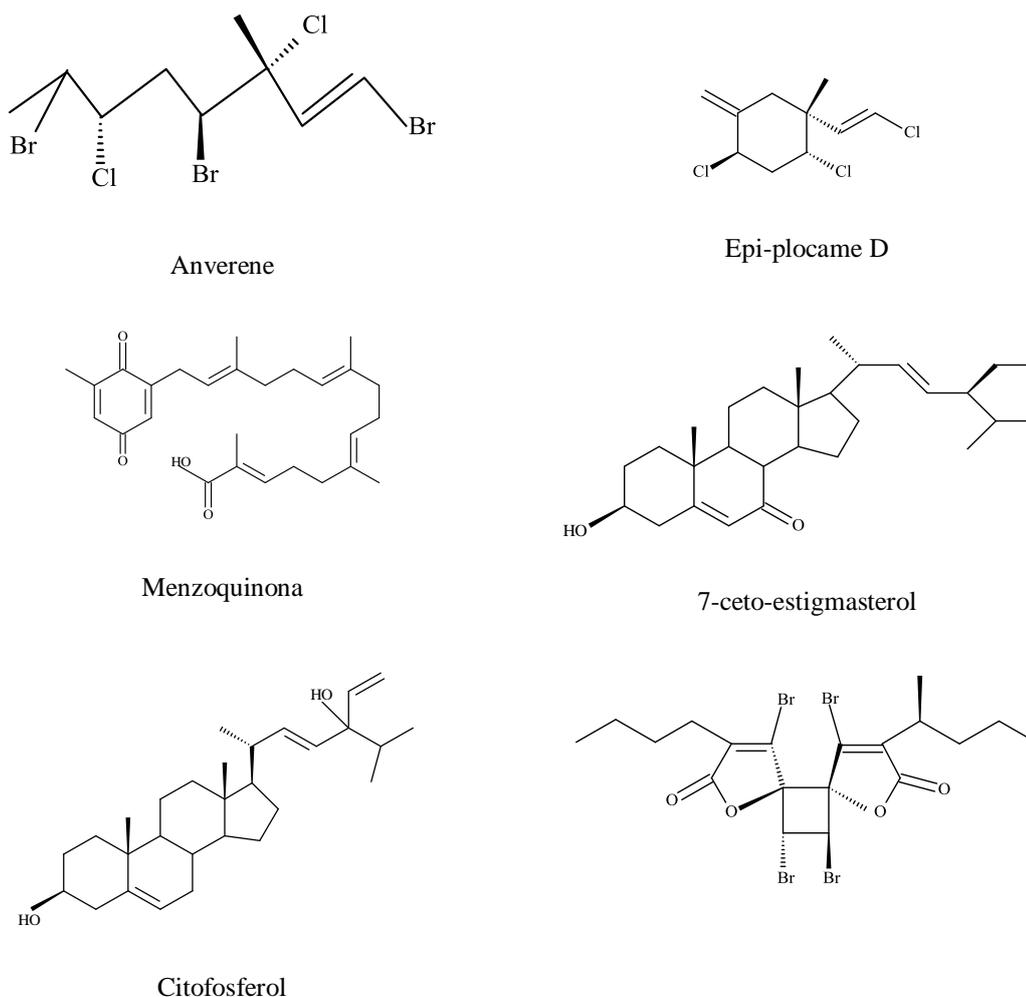


Figura 4. Estruturas de substâncias identificadas em macroalgas antárticas.

1.7 Metabolitos especiais

A produção de metabolitos primários e especiais pelas macroalgas marinhas é grandemente influenciada pela presença de agentes estressores inerentes ao próprio ambiente ou decorrente da ação antrópica. Esses agentes estressores podem ser classificados segundo sua natureza: os estressores climáticos estão associados com situações ambientais extremas, como temperaturas muito altas ou muito baixas, radiações solares inexistentes ou excessivas, altas velocidades dos ventos, seca ou excesso de umidade, ou ainda a combinação de alguns desses fatores (Freedman, 2016; Fraire-Velázquez & Balderas-Hernández, 2013).

Os estressores biológicos estão associados com interações que podem ocorrer entre organismos que vivem em um mesmo habitat sendo as mais comuns a herbívoros, predação e parasitismo (Freedman, 2016; Fraire-Velázquez & Balderas-Hernández, 2013).

Para fazer face a esses fatores, plantas e algas desenvolveram eficientes mecanismos de adaptação em múltiplos níveis de organização: molecular, tecidual, anatômica e morfológica. Em nível molecular, essa adaptação faz com que muitos genes sejam induzidos ou reprimidos e o resultado disso é a síntese de metabolitos cuja função poderá ser proteger o organismo contra baixas temperaturas ou excesso de radiação ou mesmo protegê-lo de herbívoros (Fraire-Velázquez & Balderas-Hernández, 2013).

Muitos dos metabolitos sintetizados para esses fins apresentam interessantes atividades biológicas e também se prestam a classificações quimiosistemáticas (De-Paula et al., 2012; Gouveia et al., 2013).

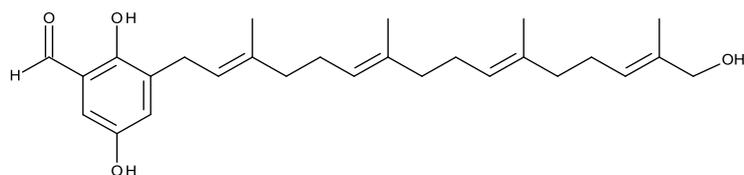
No ambiente antártico, os principais agentes estressores são as temperaturas extremamente baixas e a irradiância muito alta; a maioria das substâncias isoladas de macroalgas da região têm atividade antioxidante (Bernardi et al., 2016); de microalgas foram isoladas proteínas anticongelantes (Bayer-Giraldi et al., 2014).

De algas do gênero *Desmarestia* foram isolados os seguintes compostos: de *D. menziesii*, dois derivados do cromenol (Davyt et al., 1997) e duas plastoquinonas (Rivera et al., 1990); de *D. aculeata*, um esterol C-27, o β -caroteno, a 9-plastoquinona e a fucoxantina (Findlay & Patil, 1985) e de *D. aculeata* e de *D. viridis*, três feromônios (hidrocarbonetos cíclicos insaturados, com função hormonal) (Boland et al., 1982). Também foram identificados em *D. anceps* e *D. antarctica*, por cromatografia líquida/espectrometria de massas, além do fucosterol, o brassicasterol, o campesterol, o colesterol, o ergosterol, o β -sitosterol e o stigmasterol (Pereira et al., 2016).

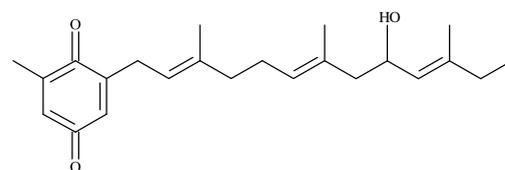
Cromenóis são uma família de substâncias formadas por um anel 2-metil-1,4-naftoquinona ligada a uma cadeia lateral isoprenoide. São membros desse grupo a vitamina K1, que tem ação anti-hemorrágica (Ishitsuka et al., 1979; Kusumi et al., 1979).

Plastoquinonas são isoprenoides formados por uma unidade 2,3-dimetil-1,4-benzoquinona ligada a uma cadeia lateral de nove unidades isoprênicas, que funcionam como transportadores de elétrons, nas reações dependentes de luz da fotossíntese (Trebst, 1978).

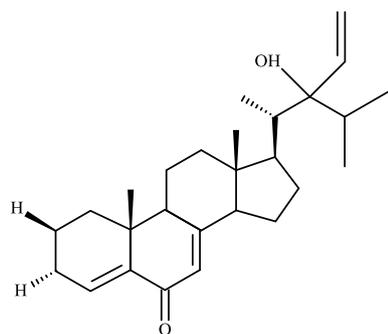
As estruturas de algumas dessas substâncias estão mostradas na abaixo.



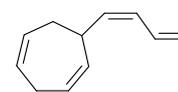
Desmarestial



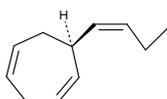
Plastoquinona



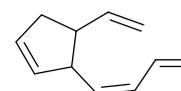
Esterol C-23



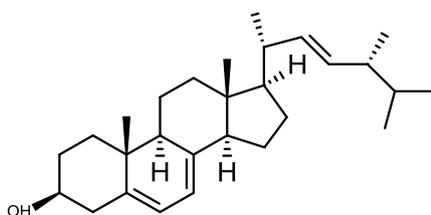
Desmaresteno



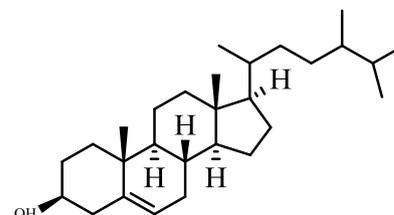
Ectocarpeno



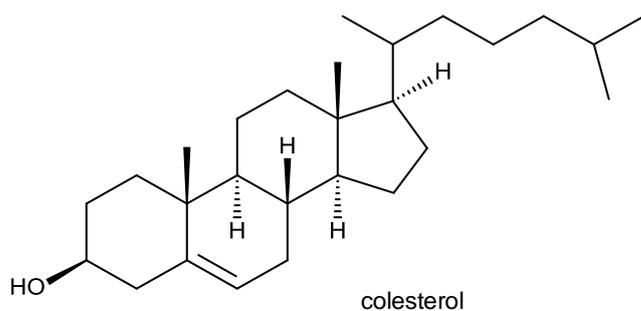
Viridieno



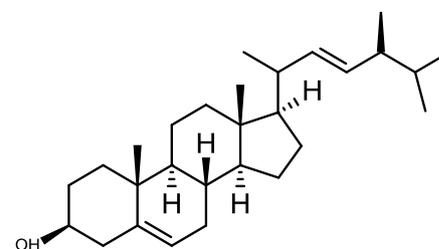
Ergosterol



Campesterol



colesterol



Stigmasterol

Figura 5. Estruturas de substâncias encontradas em espécies do gênero *Desmarestia*.

2. JUSTIFICATIVA

A identificação de substâncias ativas em *Desmarestia menziesii* contribui concretamente para o conhecimento das diversidades química e biológica dos metabolitos produzidos por macroalgas marinhas da Antártica.

A descoberta de novos possíveis agentes terapêuticos com ação anticolinesterásica vem ao encontro da necessidade de fármacos capazes de controlar os sintomas da Doença de Alzheimer de um modo mais seguro e sem tantos efeitos adversos quanto os apresentados pelas substâncias em uso.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral do presente projeto é o estudo químico e biológico dos extratos hexânico, em diclorometano, em acetato de etila e metanólico da macroalga marinha bentônica *Desmarestia menziesii* (Ochrophyta).

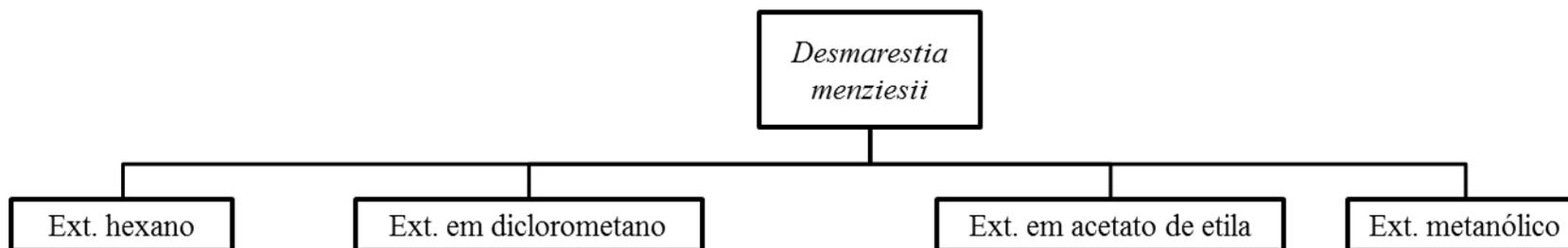
Nossos objetivos específicos são:

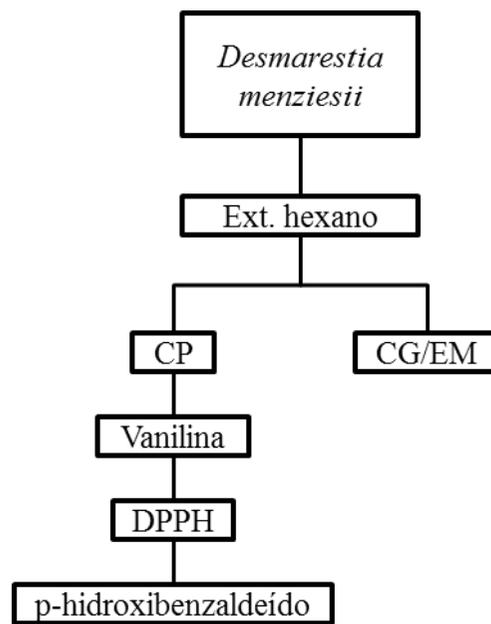
- 1) obter os extratos em hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (extração sequenciada) da biomassa liofilizada da macroalga marinha bentônica *Desmarestia menziesii*;
- 2) prospectar as atividades antifúngica, antioxidante e anticolinesterásica nesses extratos e
- 3) isolar as frações portadoras de atividades biológicas, presentes nesses extratos, por fracionamento bioguiado.

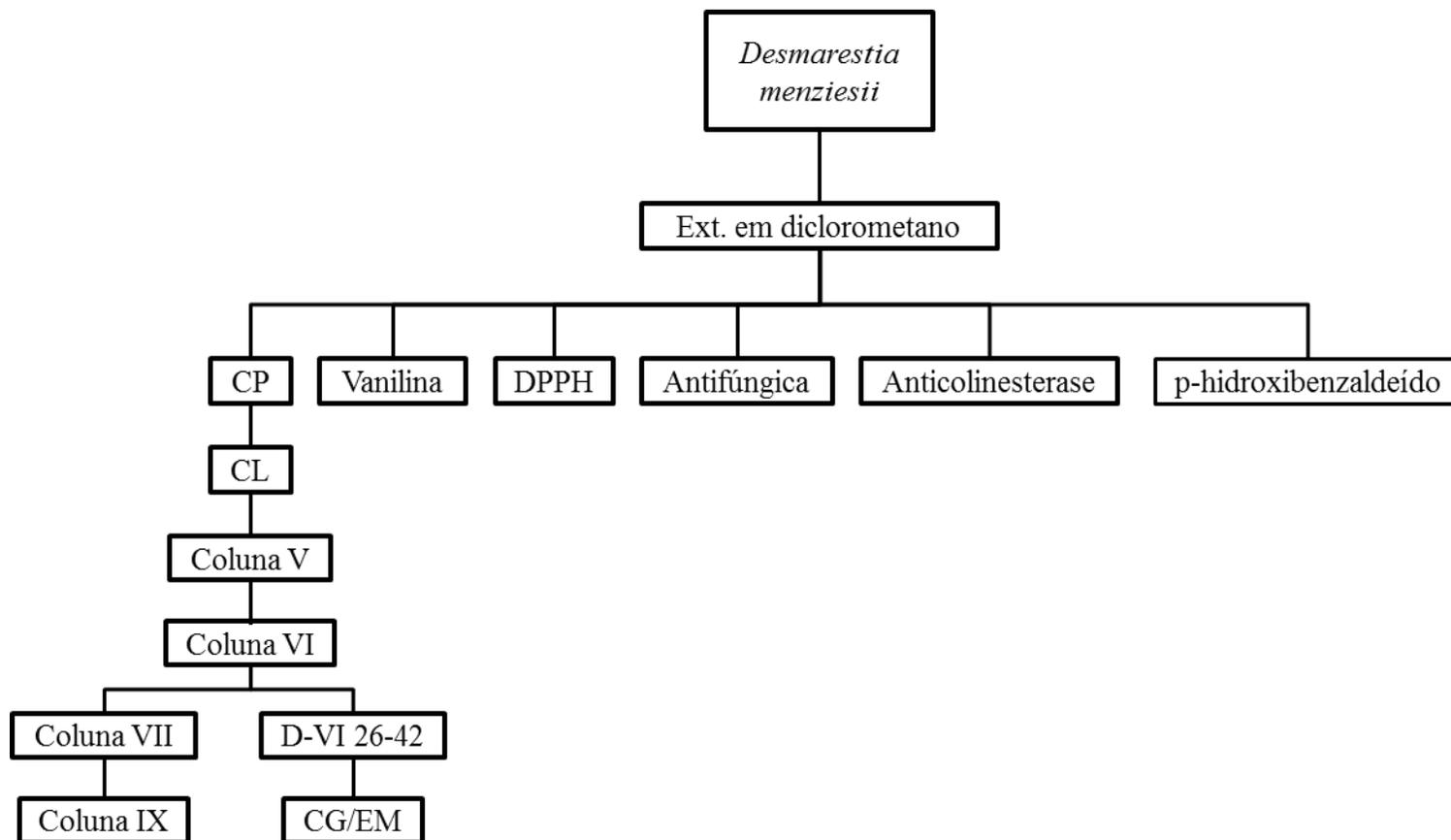
4 MATERIAL E MÉTODOS

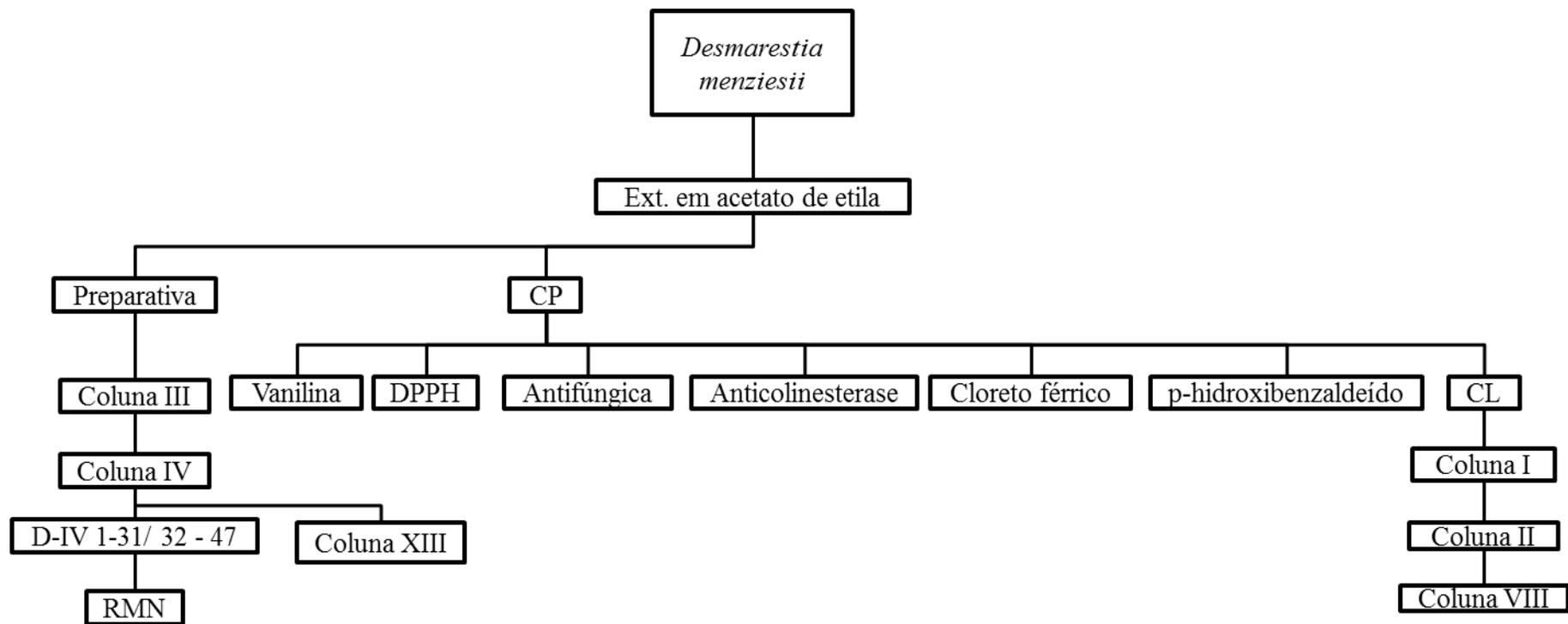
4.1 Fluxograma

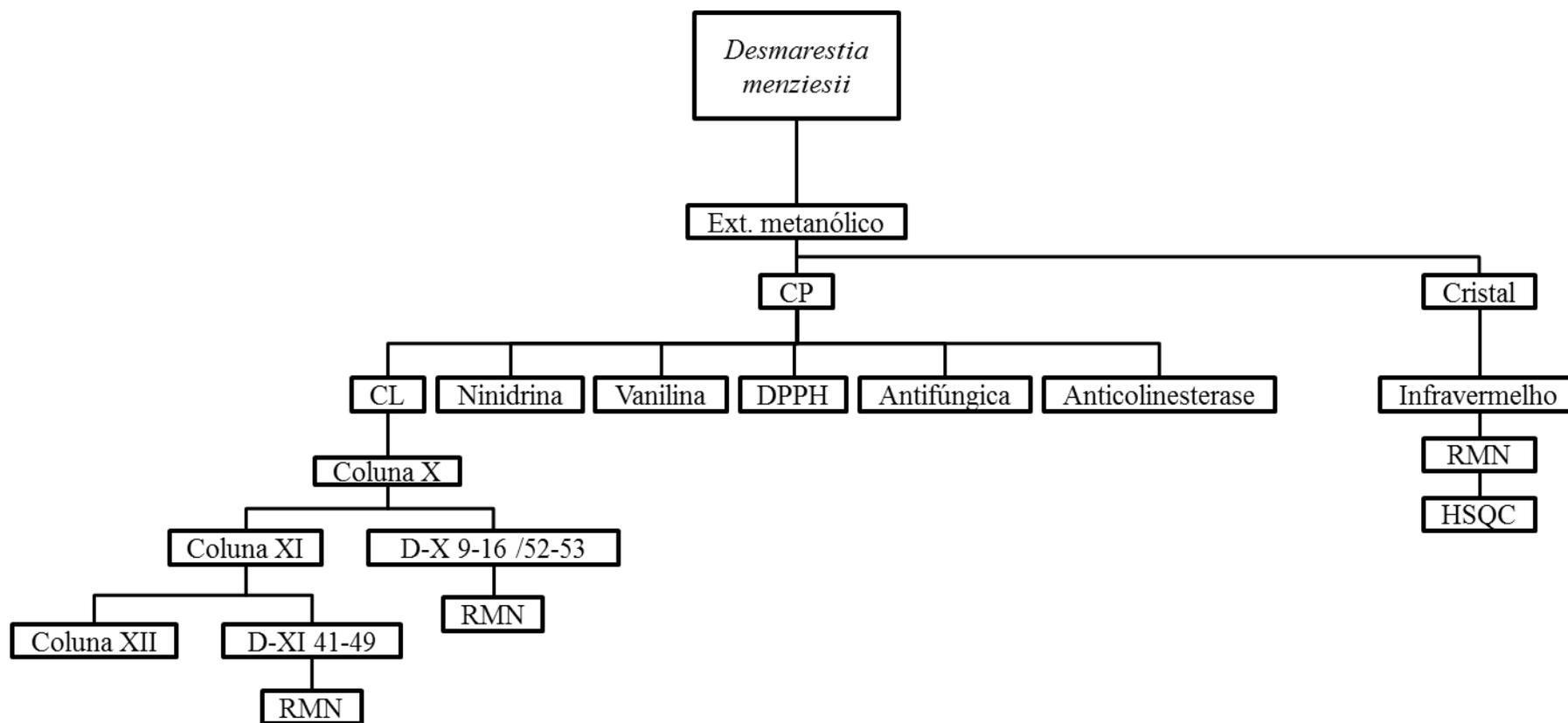
Fluxograma do exemplar de *D. menziesii* coletado na ilha Pinguim.



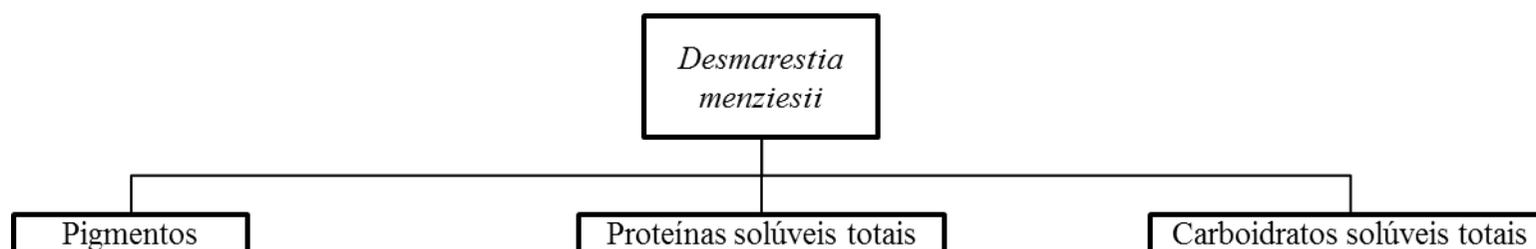








Fluxograma do exemplar de *D. menziesii* coletado na ilha Livingston.



4.2 O organismo

As amostras de *Desmarestia menziesii* foram coletadas na região antártica pela Profa. Dra. Nair Sumie Yokoya, Dra. Aline Paternostro Martins e MSc. Jônatas Martinez Canuto Souza, em 08/01/2015, na ilha Pinguim (62° 6'0"S, 57° 56'0"W) e em 12/01/2016, na ilha Livingston (62° 7'S, 60° 49'8"W), ambas localizadas na Península Antártica. O material coletado foi limpo e identificado com auxílio de microscópio e estereomicroscópio. As amostras foram, a seguir, armazenadas em freezer a -20 °C. Parte de cada amostra foi utilizada para a confecção de exsiccatas, para depósito no herbário Maria Eneyda P. Kauffman Fidalgo, no Instituto de Botânica, São Paulo (número de depósito dos exemplares: ilha Pinguim SP 470436; ilha Livingston SP 470437).

4.3 Obtenção dos extratos algáceos

A biomassa algácea foi liofilizada, triturada e submetida à extração sequenciada, assistida por ultrassom (5 x, 30 s, 100 W), com os seguintes solventes: hexano (EH), diclorometano (ED), acetato de etila (EAE) e metanol (EME). Em seguida foram secos e concentrados a vácuo (speed-vac). Os extratos secos foram estocados em frascos hermeticamente selados (Conserva et al., 2011).

4.4 Estudos químicos

4.4.1 Estudo químico do extrato em hexano, por CG/EM

Este extrato foi submetido a cromatografia por CG/EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas), em coluna ZBWax, cujo uso é recomendado para fracionamento de extratos que contenham álcoois, aldeídos, aromáticos, óleos essenciais, fragrâncias, glicóis, solventes, estireno e isômeros de xileno (30m x 0,25 mm x 0,25 µm), com injetor splitless a 250°C. A temperatura inicial da coluna de 50°C foi gradualmente aumentada em 5 °C ·min⁻¹ até 100 °C e depois em 15 °C·min⁻¹ até 200 °C. O volume injetado foi de 1 µL e a vazão da fase móvel (He) , de 1 mL·min⁻¹; o detector foi programado no modo scan . O extrato foi submetido novamente a estudo por CG-EM, desta vez em coluna HP-5MS (5%-phenylmethylpolysiloxane, 30 m x 0,25 mm, diâm. int. 0,25 µm), adequada para a

separação de aminas, hidrocarbonetos, terpenos, pesticidas, PCBs, fenóis, compostos de enxofre, aromas e fragrâncias, fenóis).

4.4.2 Estudo químico do extrato em diclorometano

Parte deste extrato (500 mg) foi submetida à cromatografia líquida em coluna (CL) (D-V), em pressão ambiente, tendo como fase estacionária gel de sílica 60 e como fase móvel a seguinte série de eluentes, em gradiente crescente de polaridade: hexano (hex)/acetato de etila (AcOEt) 95:5 (v/v); hex/AcOEt 90:10 (v/v); hex/AcOEt 80:20 (v/v); hex/AcOEt 50:50 (v/v); AcOEt 100% e metanol (ME) 100%. Foram coletadas 203 frações, que foram submetidas à cromatografia planar (CP) (sílica 20 x 20 cm, 0,25 mm, Kieselgel 60GF254, E.Merck); os cromatogramas desenvolvidos foram observados sob luz ultravioleta λ 255 e 366 nm e derivatizados com p-hidrobenzaldeído. As frações que apresentaram semelhanças foram reunidas. O grupo de frações D-V-53-68 (94 mg) foi submetido a refração por CL, em sílica (D-VI), tendo como fases móveis gradiente de hex/AcOEt em proporções variando 15% a 100% de AcOEt e metanol 100%. Foram coletadas 80 frações e, após estudo por CP (derivatização com p-hidroxibenzaldeído), foram reunidas, por semelhança, as frações D- VI- 26-42 (3,8 mg) e D-VI-51-62 (13,7 mg) e secas. As frações reunidas D- VI- 26-42 foram submetidas a estudos cromatográficos em CG/EM e a estudos por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ^1H e de ^{13}C).

As análises por CG/EM foram realizadas em cromatógrafo a gás Shimadzu (GCMS-QP2010 Plus, Kyoto), equipado com coluna HP-5MS (5%-phenylmethylpolysiloxane, 30 m x 0,25 mm, diâm. int. 0,25 μm); o hélio foi empregado como gás de arraste, em fluxo de 1,0 ml/min. A temperatura do injetor foi de 250°C e a temperatura inicial do forno foi de 60°C, tendo sofrido acréscimos de 3 °C por min até atingir 260 °C, temperatura que foi mantida por 40 min. O espectrômetro de massas foi operado com temperatura de interface de 240°C e em modo full scan, com varredura de massas de 40 a 1.000 m/z; as amostras foram ionizadas por corrente de elétrons de 70 eV. A identificação das substâncias foi feita por comparação dos dados obtidos com os das bibliotecas NIST08, NIST08s, Wiley9 and Nist Mass Spectral Search Program from Nist/ Epa/ Nih Mass Spectral Library Version 2.0.

Os índices de retenção linear foram calculados segundo o método de Kovats (IK), empregando-se a mistura de alcanos C_8 - C_{20} e C_{21} - C_{40} , como padrões externos (padrões Sigma-Aldrich). Somente substâncias com identificação inequívoca foram incluídos na tabela, ou seja, apenas aqueles cujos índices de similaridade eram iguais ou superiores a 80%.

Também foram incluídos nessa lista substâncias com espectros de massas idênticos aos encontrados na literatura.

A fração D-VI-51-62 foi perdida na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.4.3 Estudo químico do extrato em acetato de etila

a) Parte deste extrato (400 mg) foi fracionada por CL em gel de sílica 60 (D-I), eluída com as seguintes fases móveis: 1) solução de AcOEt (A) e ME (B), sendo que a porcentagem de B variou de 5 a 100% e 2) ME 100%. Após estudo por CP, as frações D-I 91-154 foram reunidas e refractionadas por CL em gel de sílica 60 (D- II) (isocrática), eluída com a fase móvel acetato de etila/metanol 99:1 (v/v); após o estudo por CP das frações obtidas, as frações D-II 27 - 51 foram reunidas, secas e submetidas a estudos por RMN de ^1H e de ^{13}C .

b) em estudo guiado por CP, com derivatização por DPPH, 320 mg deste mesmo extrato foram submetidos a CP preparativa, empregando-se como fase móvel AcOEt/ME 99:1 (v/v); a faixa de $R_f = 0,64$ foi retirada e extraída com metanol 100%, concentrada e submetida a procedimento de clean-up em coluna de gel de sílica 60, eluída com a série de solventes: éter etílico, AcOEt/ME 1%, AcOEt/ME 10% e ME 100%. Após estudo por CP, as frações 9-12 foram reunidas por similaridade, secas e submetidas a CL (Sephadex-LH-20; altura da coluna 60 cm) (D-III), eluída com a fase móvel AcOEt/ME 99:1 (v/v); Após estudo por CP, as frações D-III 1-25 e D-III 33-39 foram reunidas, assim como as frações D-III 41-51 e enviadas para estudo por RMN de ^1H e de ^{13}C . Ainda do procedimento de clean-up, as frações 15 a 19 foram reunidas, secas e submetidas a CL (Sephadex-LH-20; altura da coluna 60 cm) (D-IV), eluída com AcOEt/ME 99:1 (v/v); foram reunidas as frações D-IV 1-31 e D-IV 32-47 e enviadas também para estudo por RMN de ^1H e de ^{13}C .

4.4.4 Estudo químico do extrato metanólico.

Durante o processo de concentração a vácuo do extrato metanólico, houve formação de cristais, que foram separados por catação, lavados 5 vezes com heptano, secos em capela e submetidos a análise por RMN de ^1H e de ^{13}C e espectrometria de massas.

Da porção não cristalizada do extrato foram retirados 505 mg que foram submetidos à cromatografia em coluna aberta (isocrática) (CL) (D-X), na fase estacionária de gel de sílica 60 e com a fase móvel metanol/clorofórmio/água 68:32:8. Primeiramente foram coletados 90

mL, fração contendo pigmentos, em razão de separar os pigmentos das frações de interesse que coletou 10 mL. Foram coletadas 84 frações, que foram submetidas à cromatografia planar (CP) (sílica 20x20 cm, 0,25 mm, Kieselgel 60GF254, E.Merck), observadas sob luz ultravioleta λ 255 e 366 nm, derivatizadas com ninidrina e DPPH e reunidas em grupos, segundo semelhanças físico-químicas. O grupo de frações DX-18-34 (12,1 mg) foi refractionada em coluna aberta de gel de sílica 60 (CL), isocrática, (D-XI), eluída com a fase móvel metanol/clorofórmio/água 68:32:8. Desta coluna foram coletadas 84 frações as quais foram submetidas à cromatografia planar e derivatização com ninidrina e DPPH, o que possibilitou a reunião das frações D-XI 41 a 80. Essas frações foram submetidas a estudos por RMN de ^1H e de ^{13}C .

4.5 Análise das frações e subfrações resultantes do fracionamento dos extratos ED, EAE, EME e EA da *Desmarestia menziesii*, por Cromatografia Planar, para pesquisa de metabolitos pertencentes às classes químicas dos aminoácidos e terpenoides.

Nessas análises, foram utilizadas placas de gel de sílica (20x20 cm, 0,25 mm, Kieselgel 60G F254, E. Merck), (uma para cada teste cromatográfico) às quais foram aplicadas, manualmente, e com auxílio de capilar, amostras de 50 μg das frações e subfrações dos extratos descritos acima.

Foram empregadas, entre outras, as seguintes fases móveis: a) hex /AcOEt 15%; (v/v) (no estudo do ED) b) AcOEt/ME 1% (v/v) (no estudo do EAE) e c) metanol 68% / clorofórmio 32% / água 8% (v/v/v) (no estudo do EME).

Os cromatogramas foram desenvolvidos em atmosfera equilibrada e ao término de cada corrida cromatográfica, as placas foram secas em capela, em corrente de ar e analisadas sob luz ultravioleta, nos comprimentos de onda λ 254 e 365 nm. A seguir, cada placa foi derivatizada com um dos seguintes reagentes.

4.5.1 Ninidrina, para a pesquisa cromatográfica de aminoácidos micosporinas (Waksmundzka-Hajnos et al. 2008)

Preparo da solução de ninidrina: 200 mg do reagente ninidrina foram dissolvidos em 100 mL de etanol. As placas cromatográficas desenvolvidas e secas foram nebulizadas com a solução de ninidrina e aquecidas a 120 °C até o aparecimento de manchas roxas.

4.5.2 p-hidroxibenzaldeído, para a pesquisa cromatográfica de terpenos (Stevens, 1964)

Preparo da solução:

A) p-hidroxibenzaldeído: 2g de p-hidroxibenzaldeído diluído em 100 mL de etanol.

B) Ácido sulfúrico 50%

10 mL de p-hidroxibenzaldeído misturado a 1 mL de ácido sulfúrico 50%. A placa cromatográfica desenvolvida e seca foi nebulizada com a solução e aquecida a 120 °C.

4.5.3 Vanilina, para a pesquisa cromatográfica de aminoácidos especiais e aminas (Grupo N-H) (Merck 1971a)

Solução A: preparar uma solução de vanilina 2%, em 2-propanol;

Solução B: preparar uma solução de hidróxido de potássio 1 %, em etanol.

O cromatograma foi nebulizado com a solução A e aquecido por 10 min., a 110 °C. Se presentes, alguns aminoácidos (ornitina e lisina) tornam-se fluorescentes, sob luz ultravioleta de comprimento longo.

A seguir, o mesmo cromatograma foi nebulizado com a solução B e aquecido, em condição semelhante. Se presentes, outros aminoácidos, como a glicina, tornam-se coloridos.

4.5.4 Sulfato cérico (Merck 1971b)

Preparo da solução: 2,1 g sulfato cérico diluído em 800 ml de água destilada e 15 ml de ácido sulfúrico. A placa cromatográfica desenvolvida e seca foi nebulizada com a solução e aquecida a 120 °C.

4.5.5 Cloreto férrico (Merck 1971c)

Preparo da solução:

A) Ácido clorídrico 0,5 N: 4,25 ml de ácido clorídrico diluído em 100 mL de água destilada.

B) 2,5g de cloreto de ferro III diluído em ácido clorídrico 0,5n.

A placa cromatográfica desenvolvida e seca foi nebulizada com a solução e aquecida a 120 °C.

4.6 Extração e dosagem de pigmentos fotossintetizantes

Foram tomadas amostras das seguintes regiões do talo da macroalga: estipe, mediana e ápice. Cada uma das amostras (100 mg de massa liofilizada) foi triturada, acrescida de 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), agitada em vórtex e mantida no escuro por 20 min. Após este tempo, o sobrenadante contendo clorofila *a*, clorofila *c* e fucoxantina foi levado ao espectrofotômetro (Shimazu – UV 1800), para leitura nos seguintes comprimentos de onda: 480 nm, 582 nm, 631 nm e 665 nm. As concentrações da clorofila *a*, clorofila *c* e fucoxantina foram determinadas segundo as fórmulas de Seely et al. (1972). Os resultados foram expressos em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa fresca (MF). Nesta análise, os ensaios foram realizados em triplicata para a região mediana e ápice e em duplicata para a região do estipe.

4.7 Extração e dosagem de proteínas solúveis totais

Também para esta análise, foram coletadas amostras do estipe, região mediana e ápice. As amostras de 50 mg cada (massa liofilizada) foram trituradas e suspensas em tampão de extração (0,2 M tampão fosfato, pH 8,0, 5 mM EDTA; 1 mM DTT). As soluções foram centrifugadas (12.000 rpm a 4°C) por 15 minutos. As absorções devidas às proteínas solúveis (mensuradas nos sobrenadantes) foram obtidas por espectrofotometria no UV-visível (Shimadzu – UV 1800) a 595 nm, após a adição de solução de Comassie Blue (Bio-Rad), de acordo com o método Bradford (1976).

As concentrações dessas proteínas foram determinadas com o emprego de curva-padrão externa, construída com o padrão soro albumina bovino (BSA, Bio-Rad). Os resultados foram expressos em $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ de massa seca (MS). Nesta análise, os ensaios foram realizados em triplicata para a região mediana e ápice e duplicata para a região do estipe.

4.8. Carboidratos solúveis

4.8.1 Extração dos Carboidratos solúveis

A extração dos carboidratos solúveis foi realizada segundo Carvalho et al.(1998), com modificações. Também nessas análises foram coletadas amostras do estipe, mediana e ápice.

Amostras de 2 g de massa fresca foram liofilizadas, suspensas em 30 mL de etanol 70% e mantidas em banho-maria a 80 °C por 1h. Os sobrenadantes foram retirados. O mesmo procedimento foi repetido para todas as amostras por mais duas vezes. O resíduo final foi ressuspensionado em 30 mL de água destilada e mantido a 60 °C, em banho-maria, durante 1h. Os sobrenadantes foram retirados e armazenados e os precipitados foram submetidos ao mesmo procedimento, por mais duas vezes. Os sobrenadantes etanólicos e aquosos foram armazenados separadamente e concentrados em rotoevaporador (ou liofilizados, no caso do aquosos); após a secagem, foram ressuspensionados em 5 mL de água deionizada e armazenados a -20 °C.

Nesta análise, os ensaios foram realizados em triplicata para a região mediana e ápice e duplicata para a região do estipe.

4.8.2 Análise quantitativa dos Carboidratos solúveis

A análise dos carboidratos solúveis totais da *Desmarestia menziesii* foi realizada pelo método colorimétrico do fenol-sulfúrico, determinado por Dubois et al. (1956) e a leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro, no comprimento de onda 490 nm. Os teores de açúcar foram calculados a partir da curva padrão construída com a glicose. Nesta análise, os ensaios foram realizados em triplicata para a região mediana e ápice e duplicata para a região do estipe.

4.9 Equipamentos utilizados para a análise do extrato (EH) e das frações e subfrações resultantes do fracionamento dos extratos ED, EAE e EME da *Desmarestia menziesii*, por Cromatografia Planar, para identificação e caracterização por: CG/EM, RMN e IV.

4.9.1 CG/EM (Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa)

As substâncias foram analisadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 Plus, Shimadzu, Japão). Para o fracionamento cromatográfico foi empregada coluna HP-5ms (5% fenil-metilpolisiloxano) (30 m x 250 µm x 0.25 µm) tendo o hélio como gás de arraste, em fluxo de 1,0 mL.min (split 1:1). A temperatura inicial do forno de 60 °C teve acréscimos de 3 °C/min até atingir 260 °C, temperatura que foi mantida por 40 min. A temperatura de injeção foi de 220 °C. A detecção se deu em modo de scan completo

de 50 a 1.000 m/z. A ionização por impacto de elétrons resultou de energia de colisão de 70 eV; as temperaturas do detector e de interface foram mantidas em 240 °C.

4.9.2 RMN (Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear)

Os compostos puros foram submetidos a ^1H e ^{13}C RMN, e 2D RMN (HSQC). Os experimentos de RMN foram realizados em espectrômetro Bruker Avance III, operando a 500 MHz, equipado com sonda de 5 mm TXI, com canais dedicados a ^1H , ^{13}C e ^{15}N , de detecção inversa e com gradiente de campo e software TopSpin 3.0 (Bruker). As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados (CDCl_3 ou CD_3OD , Aldrich).

4.9.3 IV (Espectroscopia de infravermelho)

Os espectros de infravermelho das amostras sólidas foram medidos usando espectrofotômetro Thermo Scientific Nicolet iS10 FTIR com um Smart iTR.

4.9.4 Informações sobre o cromatógrafo líquido/ espectrômetro de massas (LC-MS) usado para a amostra manitol (A).

As substâncias foram analisadas em cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas (MicroTOF (Bruker, Software TOF Control 3.2.41.0). Para separação cromatográfica foi empregada coluna Kinetex PFP (100 mm x 4.6 mm x 2.6 μm), nas seguintes condições analíticas: volume de injeção foi de 5 μL ; fluxo de 500 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$; eluentes de arraste: ácido fórmico 0.1% (FMA) e metanol (FMB). O espectrômetro de massas operou no modo negativo 100-1.000 (Sigma), com calibração 99.92%; fonte de ionização por eletrospray (ESI); voltagem do capilar de 3.800V; temperatura de gás de secagem 200 °C; fluxo de gás de secagem 8.0 l mL/min; pressão de gás de nebulização 4.0 bar e End plate offset 300 V.

4.10 Estudos biológicos

4.10.1 Ensaio in vitro

4.10.1.1 Ensaio bioautográfico para análise de potencial antifúngico dos extratos obtidos de *Desmarestia menziesii* (Agrisino et al. 2004)

O fungo *Cladosporium cladosporioides* foi obtido a partir de uma matriz inicial, inoculado em placa de Petri em meio BDA (Batata, Dextrose e Ágar) e incubado por 12 dias

em estufa, à temperatura de 28°C. Após este período, foi realizada a extração dos esporos, com solução de sais e glicose (6:1).

50 µg de cada extrato e das frações e subfrações respectivamente obtidas de *Desmarestia menziesii* foram submetidos à cromatografia em camada delgada, como descrito anteriormente, desenvolvida com as seguintes fases móveis **a)** hex./ AcOEt 85:15, (v/v) **b)** AcOEt/ME 99:1, (v/v) e **c)** ME/clorofórmio/água 68:32:8, (v/v/v). Após o desenvolvimento, os cromatogramas foram secos e nebulizados com a solução de esporos, incubados em câmara úmida, mantida em estufa a 28 °C, por 2 dias e analisados em seguida. Compostos inibidores formam zonas de inibição claras, contra o fundo escuro da placa cromatográfica.

Tabela 1. Extratos e fases móveis utilizados.

Extrato	Fase móvel
ED	Hex./ AcOEt, 85:15, (v/v)
EAC	AcOEt/ME 99:1, (v/v)
EME	ME/clorofórmio/água, 68:32:8, (v/v/v)

4.10.1.2 Ensaio bioautográfico para avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Desmarestia menziesii* (Hostetmann et al. 2003)

Para esta avaliação, 50 µg de cada extrato e das frações e subfrações foram submetidos à cromatografia em camada delgada, desenvolvida com as seguintes fases móveis **a)** hex./ AcOEt 85:15, (v/v) **b)** AcOEt/ME 99:1, (v/v) e **c)** ME/clorofórmio/água 68:32:8, (v/v/v). Após o desenvolvimento, o cromatograma foi seco e nebulizado com solução metanólica (2 mg·mL⁻¹) do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), que permite detectar substâncias com atividade antioxidante, em extratos vegetais. Essas substâncias aparecem como manchas amareladas sobre fundo violeta, após a derivatização.

4.10.1.3 Ensaio bioautográfico para avaliação de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase, frente aos extratos de *Desmarestia menziesii* (Rhee et al. 2001, Marston et al. 2002)

Para a avaliação da atividade anticolinesterásica, foram aplicados, em placa cromatográfica, 50 µg dos extratos, frações e subfrações como descrito anteriormente. Fisostigmina foi empregada como controle positivo. As fases móveis utilizadas foram: **a)** hex./ AcOEt 85:15, (v/v) **b)** AcOEt/ME 99:1, (v/v) e **c)** ME/clorofórmio/água 68:32:8,

(v/v/v). Após o desenvolvimento, os cromatogramas foram secos e nebulizados com a enzima acetilcolinesterase (6.66 mL), dissolvida previamente em tampão TRIS HCl (tris-hidroximetilaminometano) 0,05M (pH 7,8) e estabilizada pela adição de 150 µg de albumina de soro bovino. Os cromatogramas foram incubados a 37 °C, durante 20 minutos, após o que, foram nebulizados com solução 1:1 de acetato de 1-naftila, em etanol e de Fast Blue salt, em água. Os inibidores da acetilcolinesterase aparecem como halos claros, sobre fundo púrpura.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos extratos algáceos

Os rendimentos dos processos de obtenção dos extratos estão na tabela 2.

Tabela 2. Massas do material algáceo liofilizado, dos extratos obtidos e seus respectivos rendimentos.

Material algáceo liofilizado (g)	Extratos (g)			
	Hexano	Diclorometano	Acetato de etila	Metanol
601, 43g	12, 40g	11,40g	4, 03g	33,45g
Rendimento %	2, 06 %	1,89 %	0,67 %	5,56 %

5.2 Avaliação de atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase

Nenhum dos extratos de *D. menziesii* apresentou atividade anticolinesterásica (Figura 6). Apenas o extrato hexânico não foi submetido a essa análise.



Figura 6. Bioautogramas para detecção da atividade anticolinesterásica dos extratos a) em diclorometano, b) em acetato de etila e c) metanólico.

5.3 Estudo químico dos extratos, EH, ED, EAE, EM.

5.3.1 Estudo químico do extrato hexânico

O cromatograma e o espectro de massas do fucosterol, obtidos do extrato hexânico após ser analisado em coluna ZBWax, estão mostrados nas figuras 7 e 8.

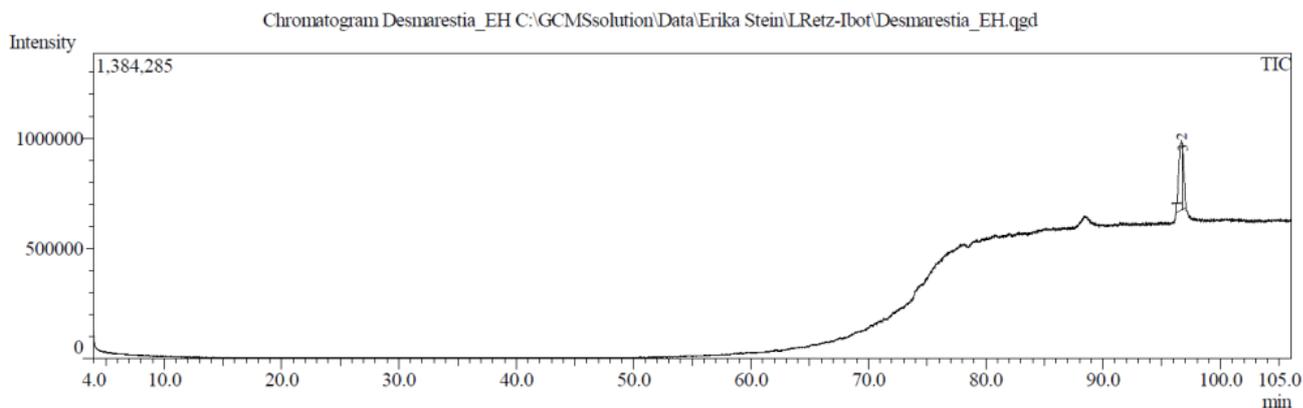


Figura 7. Cromatograma obtido do extrato hexânico de *D. menziesii*, por CG/EM, em coluna ZBWax.

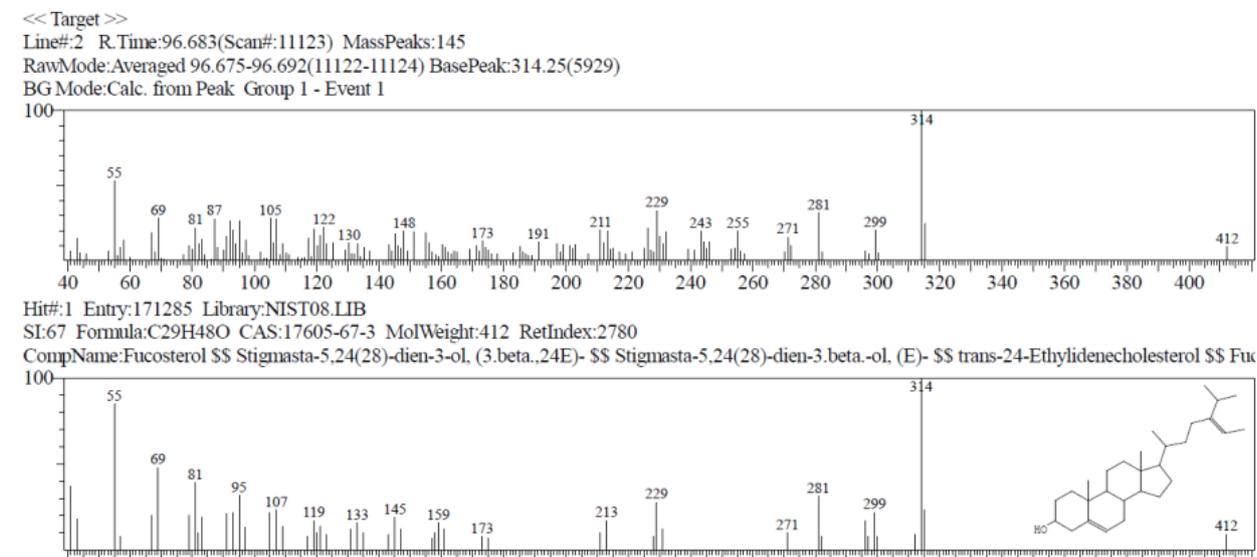


Figura 8. Espectro de massas do fucosterol, obtido por análise em CG/EM do extrato hexânico de *D. menziesii*. (superior) em coluna ZBWax e espectro de padrão fornecido pela Biblioteca NIST.

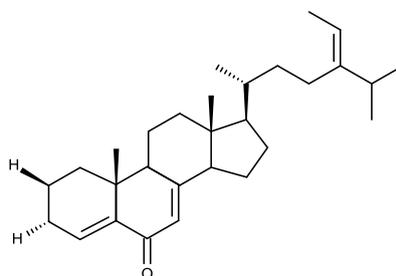
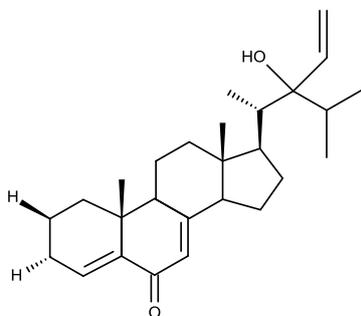
Na tabela 3 estão listadas as substâncias obtidas e os respectivos tempos de retenção e massas.

Tabela 3. Substâncias detectadas no extrato hexânico de *Desmaretia menziesii*, por CG/EM.

	Substância	Tr (min)	Área (%)	Massas Moleculares (D)	Fórmulas
1	ND*	96.250	0,54	315	—
2	Fucoesterol	96.681	71,82	412	C ₂₉ H ₄₈ O
3	5- α -pregn-2-ene- 12,20-diona	96767	27,64	314	C ₂₁ H ₃₀ O ₂

ND* = não determinada

Foram encontradas apenas três substâncias, sendo uma delas o fucoesterol (**1**), (C-29) que é comum às algas pardas, podendo ser o único esterol presente (Kerr & Baker, 1991). Até o momento, o fucoesterol ainda não havia sido detectado em *Desmaretia*, pois de *Desmaretia aculeata* foi isolado um esterol C-27 (**2**), inédito (Findlay & Patil, 1985). Neste trabalho, foi identificada também a 5- α -pregn-2-ene-12,20-diona (**3**). (Brooks e Middleditch, 1973)

**(1)**-Fucoesterol**(2)**- C-27 esterol

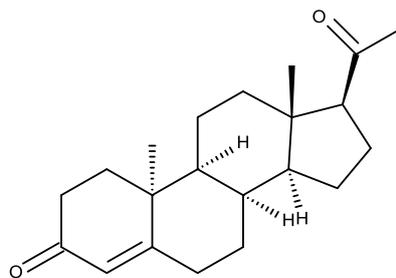
(3) - 5- α -pregn-2-ene-12,20-diona

Figura 9. Estruturas das substancias identificadas no extrato em hexânico após análise por CG-EM.

No reestudo do extrato hexânico por CG-EM, em coluna HP-5MS, foram identificadas as substâncias compiladas na tabela 4. Nela foram encontrados ftalatos, adipatos, resíduos de silicone e outros poluentes, além de metabolitos comumente encontrados em algas (Figura 10).

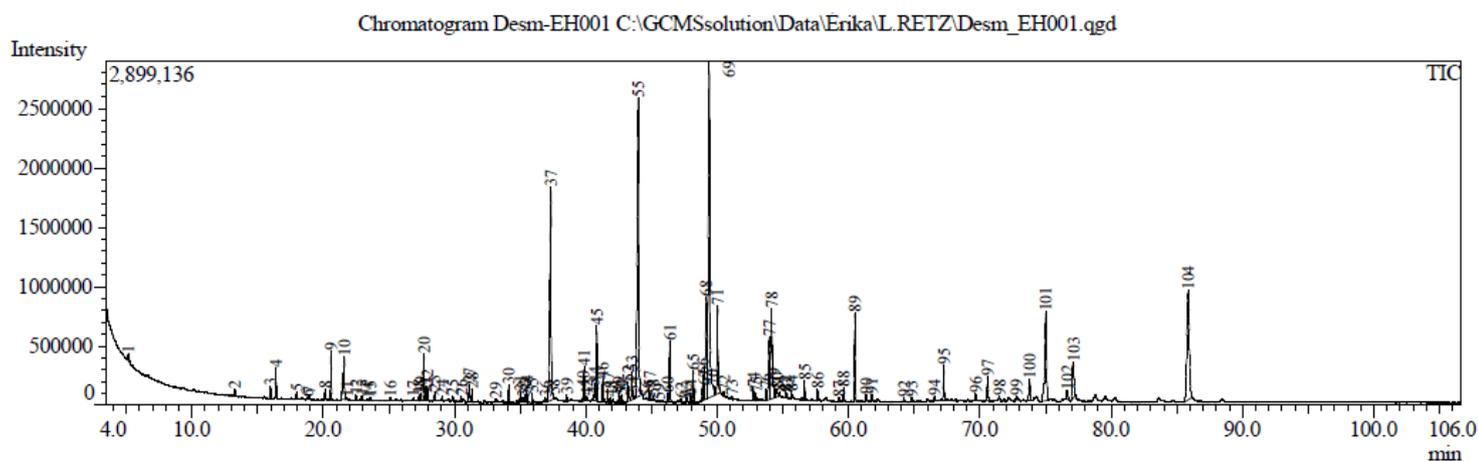


Figura 10. Cromatograma obtido do extrato hexânico de *D. menziesii* por CG/EM, em coluna HP-5MS.

Tabela 4. Substâncias (metabólitos e poluentes) identificadas por CG-EM do extrato em hexânico.

Nº	*TR (min)	*IS	*IK	Substância	Fórmula molecular	Peso molecular	%	Origem				Informações adicionais	Referências
								Algas	Vegetais e animais	# Síntese	## Síntese		
1	5,167	93	913,2	1,1,2,2-tetracloroetano	C ₂ H ₂ Cl ₄	169,85	0,02%	-	-	-	-	-	-
2	13,267	90	1157,2	Decametil-ciclopentasiloxano	C ₁₀ H ₃₀ O ₅ Si ₅	370,77	0,04%	-	-	Cosméticos e emoliente de pele	-	Resido de silicone	Pubchem/ DrugBank
3	15,975	90	1223,1	3-metil-3-(4-metil-3-pentenil)-2-oxiranecarbaldeído	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168,236	0,05%	-	-	-	-	-	-
4	17,983	89	1270,7	3,7-dimetil-2,6-octadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	152,237	0,09%	-	-	-	-	Manufatura de outros produtos químicos	Pubchem/ Physical Description from CAMEO Chemicals
5	20,15	93	1367	Ácido nerólico	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168,236	0,15%	-	-	-	-	-	-
6	20,592	94	1398,9	Dodecametil-ciclohexasiloxano	C ₁₂ H ₃₆ O ₆ Si ₆	444,924	0,16%	-	--	-	-	Resido de silicone	
7	23,383	91	1499,1	Docosano	C ₂₂ H ₄₆	310,61	0,26%	-	Plantas	-	Saborizante	Usado em sistemas orgânicos de síntese, calibração e detecção de temperatura	Kamenarska et al., 2006/ Pubchem/ Physical Description from CAMEO Chemicals
8	25,108	88	1542	4-hexen-3-ona	C ₆ H ₁₀ O	98,145	0,29%	-	-	-	Aromatizante	-	Pubchem/ HMDB

9	27,442	93	1599,7	Tricosano	C ₂₃ H ₄₈	324,637	0,35%	-	-	-	-	-	-
10	27,667	94	1605,5	Tetradecametil-cicloheptasiloxano	C ₁₄ H ₄₂ O ₅ Si ₆	458,995	0,37%	-	-	-	-	Resido de silicone	-
11	27,85	88	1610,2	Pentadecanal	C ₁₅ H ₃₀ O	226,404	0,38%	-	-	-	-	-	-
12	27,925	92	1612,2	2,4-di-terc-butilfenol	C ₁₄ H ₂₂ O	206,329	0,40%	-	-	-	-	-	--
13	28,475	88	1626,4	Dihidroactinidiolideo	C ₁₁ H ₁₆ O ₂	180,247	0,42%	-	-	-	-	-	-
14	29,867	85	1662,3	Lauril sarcosina	C ₁₅ H ₂₉ NO ₃	271,401	0,46%	-	-	-	-	-	-
15	31,117	94	1694,6	Ftalato de etila	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	222,24	0,49%	-	-	-	-	Plastificante/ torna plásticos mais flexíveis	Pubchem/ HMDB
16	31,317	92	1699,7	Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	296,583	0,51%	-	-	-	-	-	-
17	34,133	88	1776	Hexadecametil-ciclooctasiloxano	C ₁₆ H ₄₈ O ₈ Si ₈	593,232	0,55%	-	-	-	-	Resido de silicone	-
18	35,017	90	1799,9	Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	282,556	0,57%	-	-	-	-	-	-
19	35,933	91	1825,9	Octadecanoato de metila	C ₁₉ H ₃₈ O ₂	298,511	0,64%	-	Plantas	-	Agente antiespumante e nutrientes de fermentação	-	Pubchem/ HMDB
20	37,333	93	1865,6	Ácido mirístico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	228,376	0,68%	-	Gorduras animais e vegetais	Cosméticos	Saborizantes	Sabões	Pubchem/ MeSH HMDB
21	39,775	84	1936,7	Octadecetil-ciclononasiloxano	C ₁₈ H ₅₄ O ₉ Si ₉	667,386	0,73%	-	-	-	-	Resido de silicone	-
22	39,867	94	1939,4	7,11,15-trimetil, 3-metileno-1-hexadeceno	C ₂₀ H ₃₈	278,524	0,75%	-	-	-	-	-	-
23	40,058	84	1945,1	6,11,14-trimetil-2-pentadecanona	C ₁₈ H ₃₆ O	268,485	0,77%	-	-	-	-	-	-
24	40,708	90	1964,5	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	C ₂₀ H ₄₀ O	296,531	0,81%	-	-	-	-	-	Nist web

25	40,825	96	1967,9	Ftalato de diisobutila	$C_{16}H_{22}O_4$	278,348	1,04%	-	-	-	-	Plastificante	-
26	42,5	88	2018,6	(E, E) -7,11,15-trimetil-3-metileno-hexadeca-1,6,10,14-tetraeno	$C_{20}H_{32}$	272,476	0,90%	-	-	-	-	-	-
27	42,758	90	2026,7	Palmitato de metila	$C_{17}H_{34}O_2$	270,457	0,93%	-	-	-	-	-	-
28	43,983	91	2064,8	Ácido palmítico	$C_{16}H_{32}O_2$	256,43	1,01%	-	Gordura animal, vegetal e humana	-	-	-	Pubchem/ Pharmacology from NCIt/ HMDB
29	44,825	81	2091	Eicosametil-ciclododecasiloxano	$C_{20}H_{60}O_{10}Si_{10}$	741,54	1,04%	-	-	-	-	Resido de silicone	-
30	46,392	93	2121,3	Ácido docosa-hexaenóico (omega-3 triglicérides marinho)	$C_{22}H_{32}O_2$	328,496	1,12%	-	Óleo animal (peixes)	-	-	-	Pubchem/ MeSH
31	47,242	82	2135,4	Di-isopentilftalato	$C_{18}H_{26}O_4$	306,402	1,14%	-	-	-	-	Plastificante	-
32	48,183	88	2151,1	Oleato de metila	$C_{19}H_{36}O_2$	296,495	1,19%	-	-	-	-	-	-
33	49,008	87	2164,9	Octadecanoato de metila	$C_{19}H_{38}O_2$	298,511	1,23%	-	Plantas	-	Agente antiespumante e nutrientes de fermentação	-	HMDB
34	49,158	94	2167,4	(Z, Z)-9,12-ácido octadecadienoico	$C_{18}H_{32}O_2$	280,452	1,25%	-	-	-	-	-	-
35	50,033	88	2181,9	Ácido esteárico	$C_{18}H_{36}O_2$	284,484	1,30%	-	Gordura animal e vegetal	-	-	-	Pubchem/ Pharmacology from NCIt/ HMDB
36	52,758	90	2258,1	Éster metílico do ácido araquidônico	$C_{21}H_{34}O_2$	318,501	1,36%	-	Gordura animal e humana	-	-	-	Pubchem/ MeSH

37	53,975	94	2301,2	Ácido araquidônico	$C_{20}H_{32}O_2$	304,474	1,10%	-	Gordura animal e humana	-	-	-	Ahern et al., 1983/ Kim and Chojnacka, 2015/ Pubchem/ HMDB
38	55,192	83	2346	Ftalato de butilo e benzila	$C_{19}H_{20}O_4$	312,365	1,50%	-	-	-	-	Plastificante	Pubchem/ HMDB
39	56,65	89	2399,7	Bis (2-etil-hexil) adipato	$C_{22}H_{42}O_4$	370,574	1,56%	-	-	-	Aditivo alimentar indireto decorrente do contato com polímeros e adesivos	Plastificante	Pubchem/ HMDB
40	59,617	89	2513,9	Óxido de trifenilfosfina	$C_{18}H_{15}OP$	278,291	1,61%	-	-	-	-	-	-
41*	60,475	96	2547,8	Fosfato de mono (2-etil-hexil)	$C_{16}H_{22}O_4$	278,348	1,63%	-	-	-	-	Plastificante	Pubchem/ HMDB
42	67,242	94	2826,5	Esqualeno	$C_{30}H_{50}$	410,73	1,74%	-	Gordura animal, vegetal e humana	-	-	-	-
43	70,592	78	2948,9	Brometo de colessterilo	$C_{27}H_{45}Br$	449,561	1,78%	-	-	-	-	-	-
44	77,108	93	3123,9	Vitamina E	$C_{29}H_{50}O_2$	430,717	1,89%	-	Plantas	-	-	-	-
45	85,858	87	-	(3.beta) - estigmasta-5,24 (28) -dien-3-ol	$C_{29}H_{48}O$	412,702	1,90%	-	Plantas	-	-	-	-

5.3.2. Estudo químico do extrato em diclorometano

5.3.2.1. Estudo das frações reunidas D-VI 26-42 (3,8 mg)

As frações D-VI 26-42, oleosas e de cor amarelo-claro, após derivatizadas com p-hidroxibenzaldeído, mostraram-se semelhantes (Figura 11).

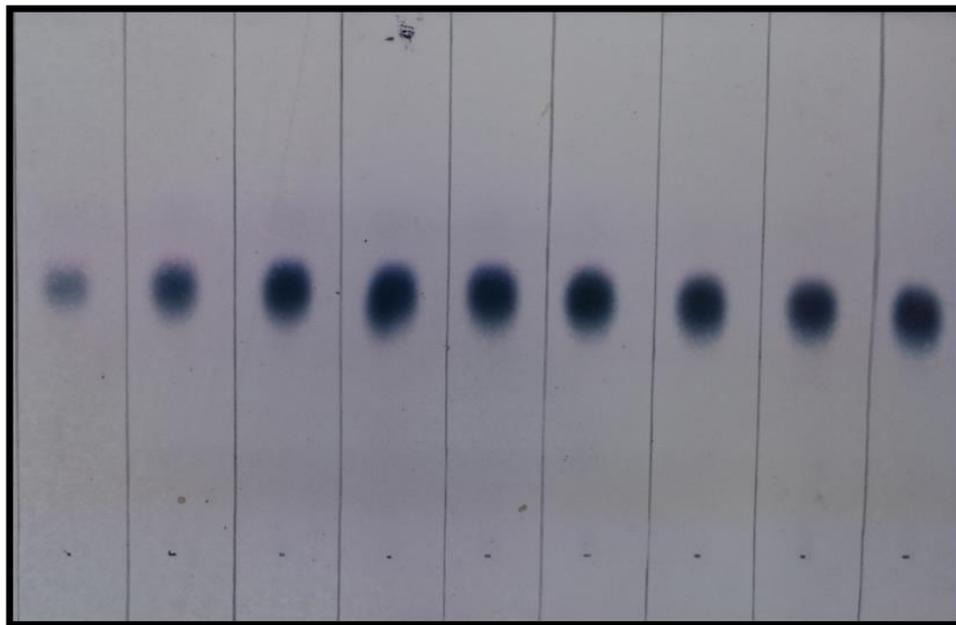


Figura 11. Cromatograma das frações D-VI 26-42, desenvolvido com a fase móvel - Hex/AEt 85:15 v/v e derivatizado com p-hidroxibenzaldeído.

O cromatograma obtido por CG/EM desta reunião de frações está mostrado na figura 12.

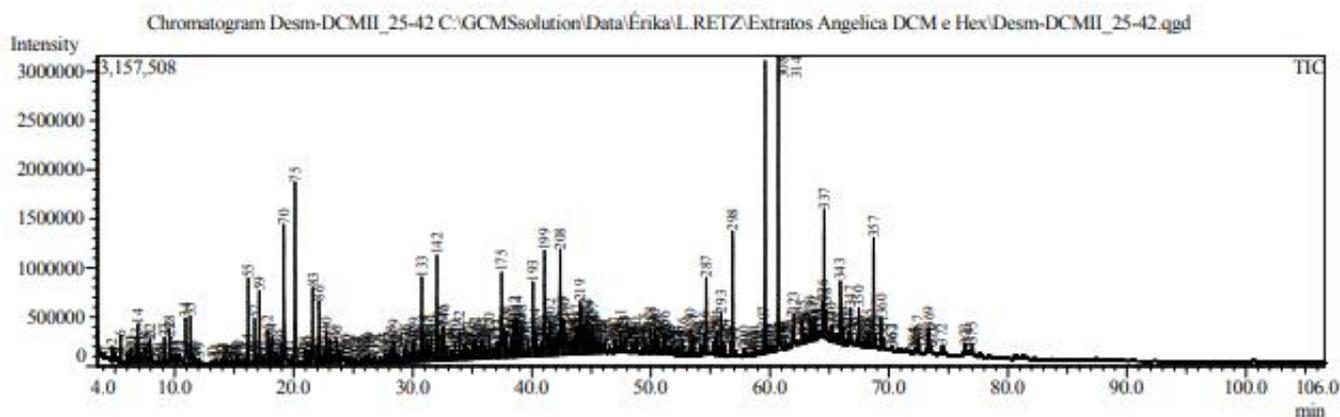


Figura 12. Cromatograma da reunião das frações D-VI 26-42, após análise por CG-EM, em coluna HP-5MS.

Apesar de ter aparência de mancha única, essa fração continha numerosas substâncias, das quais, as que puderam ser identificadas estão compiladas na tabela 5. Entre esses compostos, além daqueles considerados componentes de algas, estão hidrocarbonetos com cadeias maiores do que C23. Ora, alcanos normais com número de carbonos menor do C14 e maiores do que C23 são raríssimas exceções em macroalgas. Cadeias maiores do que C23 são apenas encontradas em determinadas microalgas verdes (*Botriococcus braunii*) (Han & Calvin, 1969; Lee & Loeblich, 1971).

Hidrocarbonetos parafínicos de cadeias mais longas são componentes do petróleo e são encontrados, como poluentes, em solos, sedimentos e corpos d'água; nos solos e sedimentos são associados com exploração de petróleo e ação antrópica, e nos oceanos, a vazamentos de oleodutos e acidentes com navios (Abha e Singh, 2012; Țigănuș et al., 2016).

Também entre as substâncias presentes nas frações reunidas D--VI 26-42 estão os ftalatos e o adipato, plastificantes encontrados em algas de outras regiões que não a Antártica, e frequentemente confundidos com substâncias sintetizadas por esses organismos (Avio et al., 2016; Gressler et al., 2012; Chan et al., 2004), além de outras substâncias poluentes.

A presença de contaminantes entre os componentes naturais em um extrato algal não é um fato inédito ou isolado. Macroalgas possuem a capacidade de reter e de acumular substâncias presentes no meio em que habitam. Esta propriedade é devida ao poder adsorvivo de seus talos formados por polissacarídeos, que nas algas pardas são principalmente os alginatos, mas também os fucanos e os laminaranos (Barahona et al., 2014; Vasconcelos, 2015).

Os alginatos são polissacarídeos lineares, aniônicos, formados por resíduos de ácido β -D-manurônico e do ácido α -L-gulurônico unidos por uma ligação (1-4). Os fucanos são formados por L-fucose, porém também contêm galactose, manose, xilose, ácido urônico e grupos sulfato; fucoidanos são homo L-fucanos sulfatados (Barahona et al., 2014; Vasconcelos et al., 2015).

A biomassa das algas marrons tem grande capacidade de reter metais pesados, sendo o alginato o principal responsável por ela. O alginato, na presença de cátions divalentes, em particular de Ca^{2+} , forma géis devido à sua estrutura em blocos polianiónicos (Barahona et al., 2014; Vasconcelos et al., 2015).

Esses polímeros, além de poderem reter cátions (metais), podem também reter substâncias moleculares, que se ligariam, por ligações de hidrogênio, aos seus numerosos grupos hidroxila, ou ainda, seriam adsorvidas pelas ações combinadas das forças de van der Waals /ligações hidrofóbicas (Garcia et al., 2018).

Em nosso estudo, os hidrocarbonetos de cadeia longa foram desorvidos da biomassa algacea com diclorometano por serem levemente mais polares do que o material extraído com hexano; o diclorometano é o solvente comumente utilizado em extrações semelhantes (Țigănuș et al., 2016).

Tem-se que considerar, também, que como o continente antártico permanece isolado dos outros oceanos pela Corrente Circumpolar Antártica e pelo vórtice ciclônico circumpolar, os poluentes existentes em suas águas ou adsorvidos por muitos organismos que nelas vivem, são resultado apenas da ação antrópica local (Zacher et al., 2009).

Especificamente em *Desmarestia* e portanto, em macroalga coletada na região antártica, Montone et al (2001) identificaram resíduos de bifenóis policlorados.

Tabela 5. Substâncias (metabolitos e poluentes) identificadas por CG-EM nas frações reunidas D-VI 26-42 (provenientes do extrato em diclorometano).

Nº	*TR (min)	*IS	*IK	Substância	Fórmula molecular	Peso molecular	%	Origem				Informações adicionais	Referências
								Algas	Vegetais e animais	# Síntese	## Síntese		
1	4,758	91	-	2,5-Octanodiona	C ₈ H ₁₄ O ₂	142,198	0,17%	-	-	-	-	-	-
2	4,833	92	-	Ciclohexanona	C ₆ O	88,065	0,07%	-	-	-	-	Produção de nylon	Pubchem/HMDB
3	4,942	91	901,6	Heptanal	C ₇ H ₁₄ O	114,188	0,17%	Macroalga	Óleos vegetais	Perfumes	Aromatizante		Sugisawa et al., 2009/ Pubchem/ NIST WebBook/
4	5,983	-	940,8	4- (1-metiletil)-ciclohexanol	C ₁₀ H ₂₀ O	156,265	0,17%	-	Ervas e especiarias/ óleos essenciais de plantas	-	-	-	Pubchem/HMDB
5	6,35	93	954,7	5-etil-2 (5H) -furanona	C ₆ H ₈ O ₂	112,128	0,24%	-	-	-	Aromatizante	-	Pubchem/EAFUS
6	6,817	96	972,3	Ácido hexanóico	C ₆ H ₁₂ O ₂	116,16	0,35%	Macroalga	Óleos vegetais e animais	Cosméticos	Aromatizante	-	Al-Saif et al., 2014/ Pubchem/ Pharmacology from NCI/ HMDB
7	6,908	95	975,7	1-octeno-3-ol	C ₈ H ₁₆ O	128,215	0,41%	-	Ervas e especiarias	-	Aromatizante	-	Pubchem/EAFUS
8	7,083	93	982,3	2,3-octanodiona	C ₈ H ₁₄ O ₂	142,198	0,17%	-	Plantas	-	Aromatizante	-	Pubchem/EAFUS

9	7,2	86	986,7	2-pentil-furano	C ₉ H ₁₄ O	138,21	0,07%	Macroalga	Óleos vegetais	-	Aromatizante	-	Sugisawa et al., 2009/ Pubchem/ HMDB
10	7,917	92	1010,3	2,4-heptadienal	C ₇ H ₁₀ O	110,156	0,38%	Macroalga	-	-	Aromatizante	-	Sugisawa et al., 2009/ Pubchem/ EAFUS
11	8,825	89	1035,9	3,3,6-trimetil-1,5-heptadieno-4-ona	C ₁₀ H ₁₆ O	152,233	0,05%	-	Plantas	-	Aromatizante	-	Pubchem/ EAFUS
12	9,608	91	1057,9	(S) -2-metil-5-oxotetra-hidrofurano-2-carboxílico	C ₆ H ₈ O ₄	144,126	0,37%	-	-	-	-	-	-
13	10,5	85	1083,1	Vinilfurano-2-(H)-ona	C ₆ H ₆ O ₂	110,111	0,08%	-	-	-	-	-	-
14	11,308	97	1105,1	Nonanal	C ₉ H ₁₈ O	142,242	0,84%	Macroalga	-	-	Aromatizante	-	Sugisawa et al., 2009/ Pubchem/ EAFUS
15	13,5	90	1158,9	Ácido benzóico	C ₇ H ₆ O ₂	122,123	0,05%	Macroalga	-	-	Aromatizante/ conservante	-	Kim and Chojnacka, 2015/ Pubchem/ HMDB
16	13,933	89	1169,5	Ácido octanico	C ₈ H ₁₆ O ₂	144,214	0,05%	Macroalga	Óleos vegetais/ leite de vários mamíferos	Perfumes	Aromatizante/corante	-	Kim and Chojnacka, 2015/ Pubchem/ HMDB
17	16,7	88	1235,9	1-hexil-ciclohexeno	C ₁₂ H ₂₂	166,308	0,54%	-	-	-	-	-	-
18	17,792	92	1261,6	(E)-2-decenal	C ₁₀ H ₁₈ O	154,253	0,52%	-	-	-	Aromatizante	-	Pubchem/ EAFUS
19	18,15	94	1270,1	Ácido nonanoico	C ₉ H ₁₈ O ₂	158,241	0,52%	-	-	-	-	Herbidas	Pubchem/ Pharmacology from NCI

20	19,45	84	1300,7	2,3,5,8-tetrametil-decano	C ₁₄ H ₃₀	198,394	0,01%	-	-	-	-	-	-
21	20,108	96	1316,4	(E-E)-2,4-decadienal	C ₁₀ H ₁₆ O	152,237	2,26%	-	Plantas	-	Aromatizante	-	Pubchem/ EAFUS/ HMDB
22	21,333	83	1345,6	1,1,2,2-tetrametil-ciclopropano	C ₇ H ₁₄	98,189	0,04%	-	-	-	-	-	-
23	22,408	84	1371,3	1,1,3-trimetil-ciclohexano	C ₉ H ₁₈	126,243	0,03%	-	-	-	-	-	-
24	23,292	91	1392,3	1-heptadeceno	C ₁₇ H ₃₄	238,459	0,09%	Cianobactéria	-	-	--	-	Rezahka et al., 1982/ Yamamoto et al., 2014
25	28,425	85	1519,5	Z, Z, Z-4,6,9-nonadecatrieno	C ₁₉ H ₃₄	262,481	0,26%	-	Plantas/ óleos vegetais	Perfumes	Saborizante	-	Attokaran, 2017
26	28,742	82	1527,7	10-metil-trans-2-decalona	C ₁₁ H ₁₈ O	166,26	0,17%	-	-	-	-	-	-
27	29,242	85	1540,6	(Z) -5-pentadeceno-7-ine	C ₁₅ H ₂₆	206,367	0,16%	-	-	-	-	-	-
28	29,8	90	1555	2-metil-1-pentadeceno	C ₁₆ H ₃₂	224,432	0,18%	-	-	-	-	-	-
29	30,1	93	1562,7	Ácido laurico	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	200,322	0,31%	Macroalga	Óleos vegetais e animais	-	-	Sabões e shampoos	Al-Saif et al., 2014/ Pubchem/ HMDB

30	30,375	88	1569,8	1-pentil-2-propil-ciclopentano	C ₁₃ H ₂₆	182,351	0,19%	-	-	-	-	-	-
31	31,258	95	1592,6	1-hexadeceno	C ₁₆ H ₃₂	224,432	0,35%	Macroalga	-	-	-	Aditivos industriais/ lubrificantes	Sugisawa et al., 2009/ Pubchem/ TSCA
32	32,033	87	1613,2	(E, Z, Z) -2,4,7-tridecatrienal	C ₁₃ H ₂₀ O	192,302	1,19%	-	-	-	Aromatizante/ saborizante	-	-
33	32,208	87	1617,9	1,5-dietenil-3-metil-2-metileno-ciclo-hexano	C ₁₂ H ₁₈	162,276	0,32%	-	-	-	-	-	-
34	32,483	96	1625,4	Difenil-metanona	C ₁₃ H ₁₀ O	182,222	0,42%	-	Frutas	-	Aromatizante	-	Pubchem/ HMDB
35	33,367	83	1649,3	3,5,24-trimetil-tetracontano	C ₄₃ H ₈₈	605,177	1,32%	-	-	-	-	-	-
36	34,658	92	1684,2	1-hidroxiciclohexilfenil cetona	C ₁₃ H ₁₆ O ₂	204,269	0,20%	-	-	-	-	-	-
37	35,242	93	1700,1	Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	296,583	0,29%	Macroalga	-	-	Aromatizante	Detergentes/ ceras	Abou-El-Wafa et al., 2011/ Pubchem/ HMDB
38	35,458	92	1706,2	2,6,10,14-tetrametil-hexadecano	C ₂₀ H ₄₂	282,556	0,27%	Macroalga	-	-	-	-	Abou-El-Wafa et al., 2011/ Pubchem
39	35,592	86	1710	Benzoato de etilhexila	C ₁₅ H ₂₂ O ₂	234,339	0,16%	-	Plantas e animais	Emolientes para pele	Aromatizante/ conservante	-	Pubchem/ EWG's Skin Deep -

													Cosmetics Database/ HMDB
40	36,45	80	1734,3	Loliolide	C ₁₁ H ₁₆ O ₃	196,246	0,45%	Macroalga	Plantas e animais	-	-	-	Grabarczyk et al., 2015/ Pubchem
41	37,467	-	1763,2	Benzoato de benzilo	C ₁₄ H ₁₂ O ₂	212,248	1,55%	-	Plantas	Conservantes de cosméticos	Aromatizante	Tratamento de alergias e dermatite de contato	Attokaran et al., 2017/ Pubchem/ EWG's Skin Deep - Cosmetics Database/ HMDB/ EAFUS
42	38,142	88	1782,3	5-eicoseno	C ₂₀ H ₄₀	280,54	0,28%	-	Plantas/ óleos vegetais	-	-	-	Bai et al., 2005/ Pubchem
43	38,325	92	1787,5	Trifluoroacetato de tetradecil	C ₁₆ H ₂₉ F	310,396	0,28%	-	-	-	-	-	-
44	39,133	86	1810,9	2,7,12-tetradecatrieno	C ₁₄ H ₂₄	192,346	0,65%						
45	39,692	83	1827,6	Miristato de isopropila	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,457	0,20%	-	-	Shampoos/ cremes	Aromatizante/ saborizante	-	Pubchem/ EWG's Skin Deep - Cosmetics Database/ HMDB/ EAFUS
46	40,1	92	1839,7	Fitol	C ₂₀ H ₄₀ O	296,539	1,51%	Macroalga	-	-	Aromatizante	Formas sintéticas da vitamina E	Sugisawa et al., 2009/ Kim and Chojnacka, 2015/ Pubchem/ HMDB
47	40,95	86	1865	Neofitadieno	C ₂₀ H ₃₈	278,524	0,31%	Macroalga	-	-	-	Inibidor enzimático	Peres et al., 2012/ Pubchem/ SCBT

48	41,058	97	1868,2	Ftalato de diisobutilo	C ₁₆ H ₂₂ O ₄	278,348	1,86%	-	-	-	-	Plastificantes	Gao and Wen, 2016/ Pubchem
49	41,333	82	1876,4	Icosapente	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	302,458	0,39%	Macroalga	Óleos de peixe	-	-	-	Kim and Chojnacka, 2015 / Pubchem
50	41,525	88	1882,1	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadeceno-1-ol	C ₂₀ H ₄₀ O	296,531	0,76%	-	-	-	-	-	Nist web
51	42,392	87	1908,3	Éster etílico do ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	332,52	1,45%	-	-	-	-	Estereoisómero: fitol/ cis fitol	Hattab et al. 2011
52	44,075	79	1960,6	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256,43	1,25%	Macroalga	Óleos vegetais	-	Aromatizante	-	Al-Saif et al., 2014/ Kim and Chojnacka, 2015/ Attokaran et al., 2017/ Pubchem/ HMDB/ EAFUS
53	45,117	94	1993,1	1-nonadeceno	C ₁₉ H ₃₈	266,513	0,17%	Cianobactéria	-	-	-	-	Goodloe and Light, 1982/ Pubchem
54	45,325	-	1999,6	Ácido 2,4-dimetil-2E-tetradecenóico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	254,408	0,20%	-	-	-	-	-	-

55	45,767	81	2013,9	1,4a.beta-dimetil-7-isopropil-1,2,3,4,4a,9,10,10a.alfa-octa-hidrofenantreno	$C_{20}H_{28}O$	284,435	0,10%	-	-	-	-	-	-
56	46,133	89	2025,8	Palmitato de isopropila	$C_{19}H_{38}O_2$	298,511	0,16%	-	-	Cosméticos	Aromatizante	Lubrificantes e graxas	Pubchem/ HMDB/ EAFUS/ TSCA
57	46,958	80	2052,5	3-alil-2,6,6-trimetilbicyclo [3.1.1] heptano	$C_{13}H_{22}$	178,314	0,30%	-	-	-	-	-	-
58	47,475	71	2069,3	Ftalato de amil	$C_{18}H_{26}O_4$	306,402	0,17%	-	-	-	-	Plastificante	Gao and Wen, 2016/ Pubchem/ HMDB
59	47,8	80	2079,9	Anidrido do ácido n-heptanóico	$C_{14}H_{26}O_3$	242,359	0,53%	-	-	-	-	-	-
60	49,467	85	2135,6	Ácido oleico	$C_{18}H_{34}O_2$	282,468	0,30%	Macroalga	-	-	Emulsificante	Emulsionante farmacêuticos	Al-Saif et al., 2014/ Kim and Chojnacka, 2015/ Attokaran et al., 2017/ Pubchem/ HMDB/ EAFUS/ TSCA

61	49,975	88	2152,9	Maleato de bis (2- etilhexil)	$C_{20}H_{36}O_4$	340,504	0,53%	-	-	-	-	Plastificante/ adesivos e selantes, tintas e revestimentos	Pubchem/ TSCA
62	50,192	90	2160,3	Ácido esteárico	$C_{18}H_{36}O_2$	284,484	0,20%	Macroalga	Óleos vegetais e animais	-	Aromatizante	-	Al-Saif et al., 2014/ Kim and Chojnacka, 2015/ Attokaran et al., 2017/ Pubchem/ HMDB/ EAFUS/ TSCA
63	50,3	91	2163,9	2-etilhexil p- metoxicinamato	$C_{18}H_{26}O_3$	290,403	0,30%	-	Óleos vegetais/ ervas e especiarias	Protetor solar/ cosméticos	-	-	Schlumpf et al., 2004 / Pubchem/ DrugBank/ HMDB
64	50,483	89	2170,1	2-Butil-1,1,3- trimetilciclohexano	$C_{13}H_{26}$	182,351	0,23%	-	-	-	-	-	-
65	51,033	92	2188,8	Álcool Lignocérico	$C_{24}H_{50}O$	354,663	0,15%	Macroalga	-	-	-	-	Renukadevi et al., 2011/ Pubchem
66	51,167	91	2193,4	1-heptacosanol	$C_{27}H_{56}O$	396,744	0,28%	Macroalga	-	-	-	-	Renukadevi et al., 2011/ Pubchem
67	51,325	87	2198,8	Docosano	$C_{22}H_{46}$	310,61	0,16%	Macroalga	Plantas	-	Saborizante	-	Kamenarska et al., 2006/ Pubchem/ HMDB

68	52,65	87	2245,6	Laurato de isopentil	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270,457	0,22%	-	-	Perfumes/ condicionante e emoliente de pele	Aromatizante	-	Pubchem/ EWG's Skin Deep - Cosmetics Database/ HMDB/ EAFUS
69	53,317	90	2269,2	Acetilcitrato de tributil	C ₂₀ H ₃₄ O ₈	402,484	0,40%	-	-	Esmaltes/ Cosméticos	Aromatizante	Plastificantes	Pubchem/ HMDB/ EAFUS
70	53,633	85	2280,4	1,3,12-nonadecatrieno	C ₁₉ H ₃₄ O	262,481	0,12%	-	-	-	-	-	-
71	54,167	83	2299,3	1-iodo-hexadecano	C ₁₆ H ₃₃ I	352,344	0,16%	-	-	-	-	-	-
72	54,508	85	2311,9	Dihidro-5-tetradecil- 2(3)-furanona	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	282,468	0,37%	Macroalga	Plantas	-	-	-	Rocha et al., 2011/ Pubchem
73	55,223	86	2338,2	Metil desidroabietate	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	314,469	0,13%	Macroalga	-	-	-	-	Sivakumar et al., 2014/ Pubchem
74	55,575	87	2351,2	4,8,12,16- tetrametilheptadecano- 4-olido	C ₂₁ H ₄₀ O ₂	324,549	0,36%	-	Plantas	-	-	-	Hong et al., 2010/ Pubchem
75	55,675	84	2354,8	1-trideceno	C ₁₃ H ₂₆	182,351	0,07%	-	Óleos vegetais	-	-	-	Pubchem/ HMDB/ EAFUS
76	55,908	89	2363,4	2- (1-metiletil) -9H- tioxanten-9-ona	C ₁₆ H ₁₄ OS	254,347	0,61%	-	-	-	-	-	-
77	56,108	87	2370,8	1-hexacoseno	C ₂₆ H ₅₂	364,702	0,19%	-	Plantas	-	-	-	Pubchem/ HMDB

78	56,733	93	2393,8	Pentafluoropropionato de nonadecil	$C_{22}H_{39}F_5O_2$	430,287	0,19%	Microalga	-	-	-	-	Renukadevi et al., 2011/ Pubchem
79	56,867	95	2398,7	Bis (2-etil-hexil) adipato	$C_{22}H_{42}O_4$	370,574	1,61%	-	-	-	-	Plastificantes	Gao and Wen, 2016/ Pubchem/ HMDB
80	58,367	82	2456,2	1-54-dibromo-tetrapentacontano	$C_{54}H_{108}Br_2$	917,266	0,03%	Cianobactéria	-	-	-	-	Ramasamy and Gopalakrishnan, 2013/ Pubchem
81	58,758	82	2471,1	Ácido araquidônico	$C_{20}H_{32}O_2$	304,474	0,12%	Macroalga/ microalga	Gordura animal e humana	-	-	-	Ahern et al., 1983/ Kim and Chojnacka, 2015/ Pubchem/ HMDB
82	59,608	84	2503,9	Ácido palmítico de éster de N-octilo	$C_{24}H_{48}O_2$	368,646	3,71%	-	-	-	-	-	-
83	60,708	98	2547,6	Fosfato de mono (2-etil-hexil)	$C_{16}H_{22}O_4$	278,348	3,78%	-	-	-	-	Plastificantes	Gao and Wen, 2016/ Pubchem/ HMDB
84	61,092	80	2562,9	2-4-dimetil-eicosano	$C_{22}H_{46}$	310,61	0,02%	-	-	-	-	-	-
85	61,325	88	2572,1	(Z)-9-tricoseno	$C_{23}H_{46}$	322,321	0,52%	-	-	-	-	Feromônio de insetos/ pesticidas/ inseticidas	Hanley et al., 2004/ Pubchem

86	62,308	82	2611,6	Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	254,502	0,04%	Macroalga	Plantas	-	-	-	Kamenarska et al., 2006/ Sugisawa et al., 2009/ Pubchem/ HMDB
87	62,7	82	2627,7	4,7,10,13,16,19 -ócido de ácido docosa-hexaenóico, (all-Z) -	C ₂₃ H ₃₄ O ₂	342,523	0,30%	-	-	-	-	-	-
88	63,417	91	2657,1	Hexacontano	C ₆₀ H ₁₂₂	843,636	0,54%	Cianobactéria	-	-	-	-	Ananya and Kamal, 2016/ Pubchem
89	64,433	95	2698,9	Hexatriacontano	C ₃₆ H ₇₄	506,988	0,34%						
90	64,567	84	2704,6	Octadecanoato de octilo	C ₂₆ H ₅₂ O ₂	396,7	1,54%	-	-	Creme para pele	-	-	Xhaufaire-Uhoda et al., 2008/ Pubchem
91	64,75	88	2712,4	Pentatriacontano	C ₃₅ H ₇₂	492,961	0,56%	Macroalga	-	-	-	-	Karabay-Yavasoglu et al., 2007/ Pubchem
92	65,925	91	2762,4	Tetrapentacontano	C ₅₄ H ₁₁₀	759,474	0,03%	Cianobactéria	-	-	-	-	Ramasamy and Gopalakrishnan, 2013/ Pubchem
93	66,15	80	2772	Ftalato de bis (tridecil)	C ₃₄ H ₅₈ O ₄	530,834	0,42%	-	-	-	-	Plastificantes	Gao and Wen, 2016/ Pubchem/ HMDB

94	66,775	94	2798,7	Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	338,664	0,46%	Macroalga	Plantas/ óleos vegetais	-	-	-	Kamenarska et al., 2006/ Karabay-Yavasoglu et al., 2007/ Pubchem/ HMDB
95	66,908	83	2804	Ftalato de dinonilo	C ₂₆ H ₄₂ O ₄	418,618	0,04%	-	-	-	-	Plastificantes	Gao and Wen, 2016/ Pubchem
96	67,483	89	2826,3	Esqualeno	C ₃₀ H ₅₀	416,767	0,58%	Macroalga	Gordura animal, vegetal e humana	-	-	-	Kamenarska et al., 2006/ Kim and Chojnacka, 2015/ Pubchem/ HMDB
97	68,717	87	2874,1	14-beta-H-pregna	C ₂₁ H ₃₆	288,51	0,13%	-	-	-	-	-	Durak & Kalender, 2007.
98	69,35	92	2898,6	Dotriacontano	C ₃₂ H ₆₆	450,88	0,48%	Macroalga	Plantas	-	-	-	Kamenarska et al., 2006/ Pubchem/ HMDB

* TR - tempo de retenção (minutos) / IS - índice de similaridade/ BD - banco de dados/ IK – índice de Kovats

Síntese - Produtos para cuidados especiais / ## Síntese - Aditivos alimentares

5.3.3 Estudo químico do extrato em acetato de etila

As frações D-II-27-51; D-III-33-39; D-III-41-51; D-III-53-77; D-IV-1-31; D-IV-32-47; D-VIII-23-27 e D-VIII-28-33 que eluíram da coluna por filtração em gel, apareceram como manchas únicas em estudo por cromatografia planar e mostraram intensa fluorescência azul sob luz ultravioleta de comprimento de onda 366 nm (Figura 13) e apresentou atividade antifúngica.

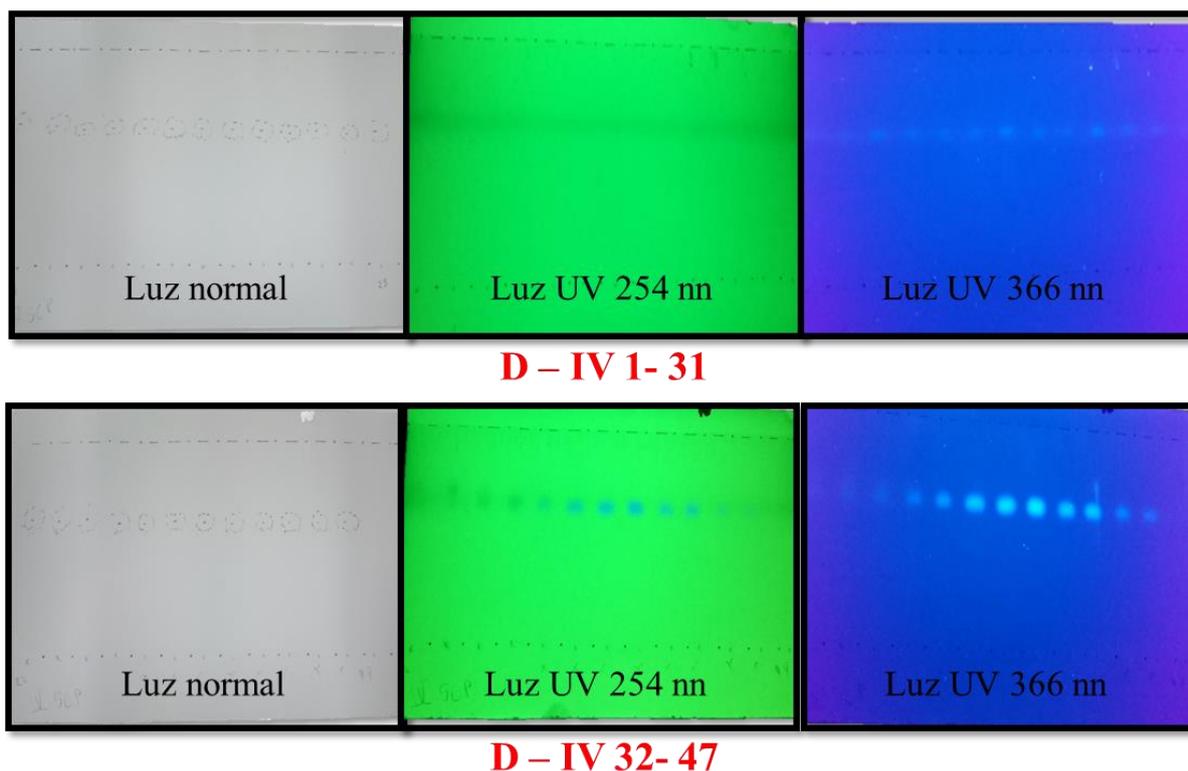


Figura 13. Cromatogramas das frações D-IV 1-31 e 32- 47, desenvolvidos com a fase móvel - AcOEt/MeOH 99:1 v/v, observados sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda 254 nm e 366 nm.

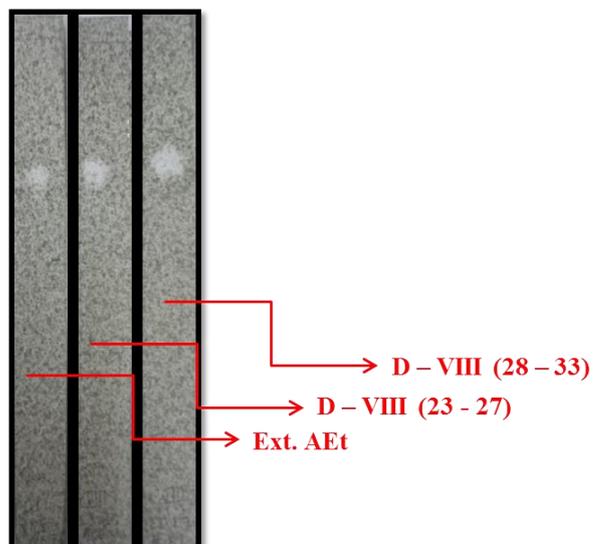


Figura 14. Bioautogramas do extrato bruto e das frações D-VIII 23 - 27 e 28 - 33 [eluidas de CL de Sephadex-LH-20], desenvolvidos com a fase móvel – AcOEt/MeOH 99:1 v/v, em que são visíveis os halos brancos de inibição do fungo *Cladosporium cladosporioides*.

O estudo detalhado dos espectros de ^1H RNM destas frações permitiu caracterizá-la como uma mistura contendo substâncias aromáticas (Figure 15). Os sinais entre δ 8.0 e δ 6.0 são devidos a hidrogênios aromáticos: os sinais entre δ 8.0 e δ 7.0 são devidos a hidrogênios ligados a anel aromático ao qual estão diretamente ligados grupos hidroxila, carboxila ou metílicos, ou ainda grupos mais complexos. Os sinais entre δ 6.9 e δ 6.0 são observados também nos hidrogênios aromáticos dos meroterpenos das algas pardas (Davyt et al., 2016; Lee & Seo, 2011; Jang et al., 2005; Numata et al., 1992; Rivera et al., 1990; Kusumi et al., 1979; Ishitsura et al., 1979).

O sinal em δ 9.3 é devido a hidrogênio pertencente a grupo aldeídico; o grupo aldeídico pode ser observado em algumas moléculas de meroterpenos isolados de *Sargassum* and *Desmaretia* (Davyt et al., 2016; Jang et al., 2005; Numata et al., 1992; Rivera et al., 1990).

Os sinais entre δ 4.0 e δ 5.6 ppm podem ser atribuídos aos hidrogênios olefínicos presentes nas cadeias laterais de *Sargassum* e *Desmaretia* (Davyt et al., 2016; Jang et al., 2005; Numata et al., 1992; Rivera et al., 1990).

Sinais, que podem ser atribuídos a hidrogênios ligados a carbonos sp^3 são observados entre δ 2 e δ 3 ppm. Sinais devidos a grupos metílicos e metilênicos podem ser vistos entre δ 0,8 e 1,7 ppm.

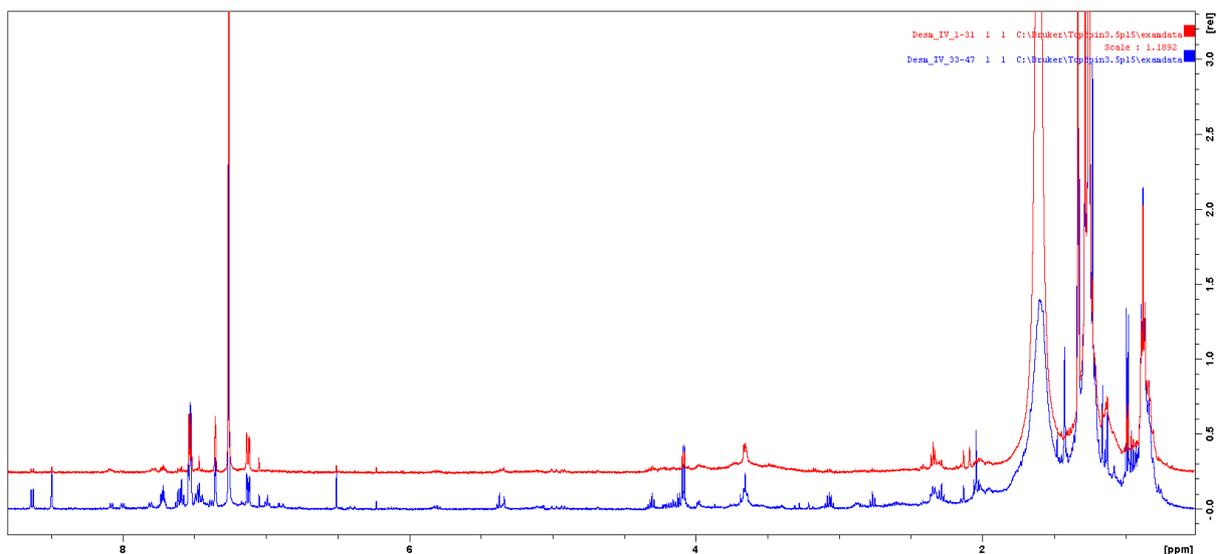


Figura 15. Espectros (superpostos) de RMN de ^1H das frações D-IV 1-31 e D-IV 32- 47 (500 MHz, CDCl_3).

5.3.4 Estudo químico do extrato em metanol

5.3.4.1. Determinação de estrutura de substância isolada

O rendimento, em massa, das frações reunidas D-MeOH –X- 9-16, D-MeOH –X- 52-53 e D-MeOH-XI- 41-49 (Figuras 16, 17 e 18) foi muito baixo, motivo pelo qual só foi possível obter delas o espectro de RMN de ^1H ; as quantidades obtidas não permitiram realizar outros fracionamentos, necessários, por exemplo, nas frações reunidas D-MeOH-XI- 41-49 e D-MeOH –X- 52-53.

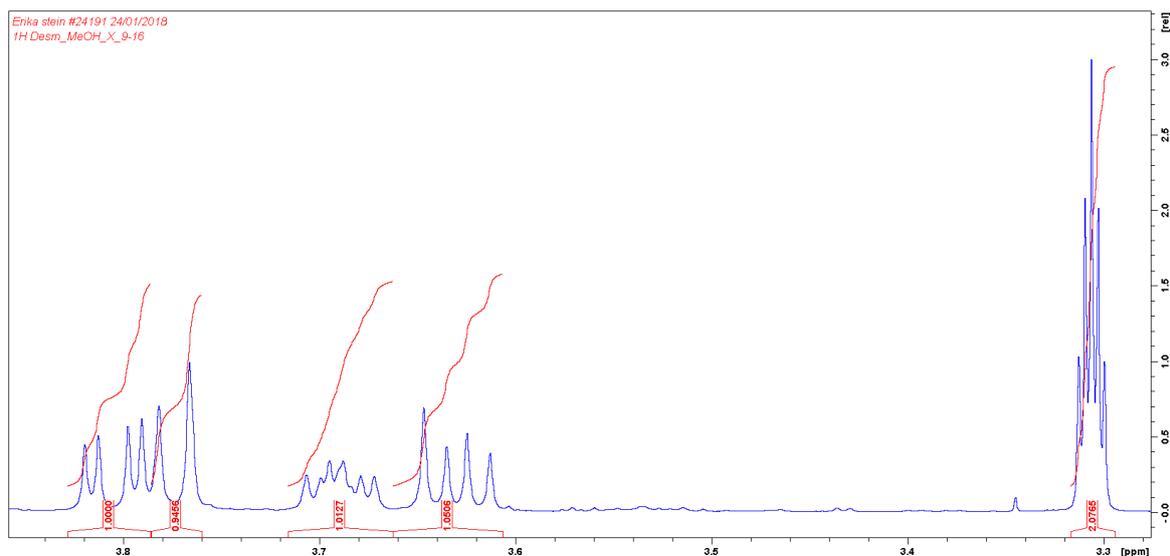


Figura 16. Espectro de Ressonância Nuclear Magnética de ^1H das frações reunidas D-MeOH –X- 9-16 (500 MHz, MeOD).

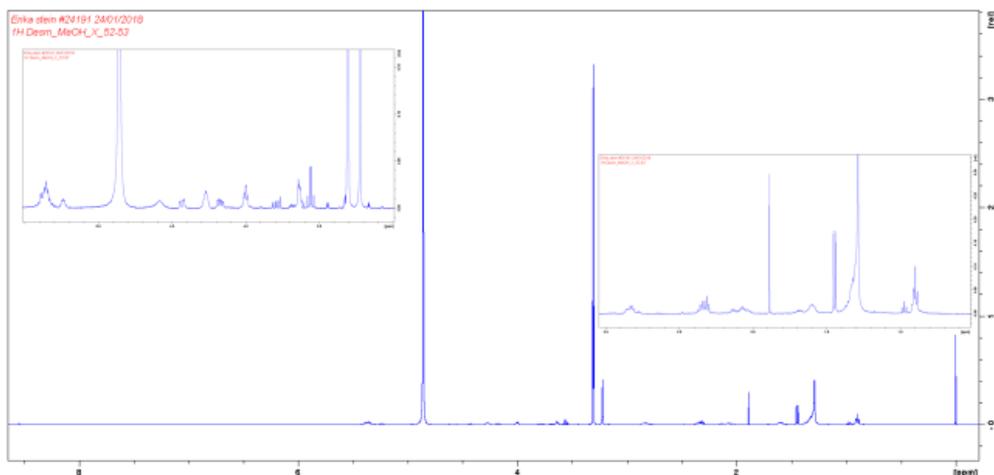


Figura 17. Espectro de Ressonância Nuclear Magnética de ^1H das frações reunidas D-MeOH -X- 52-53 (500 MHz, MeOD).

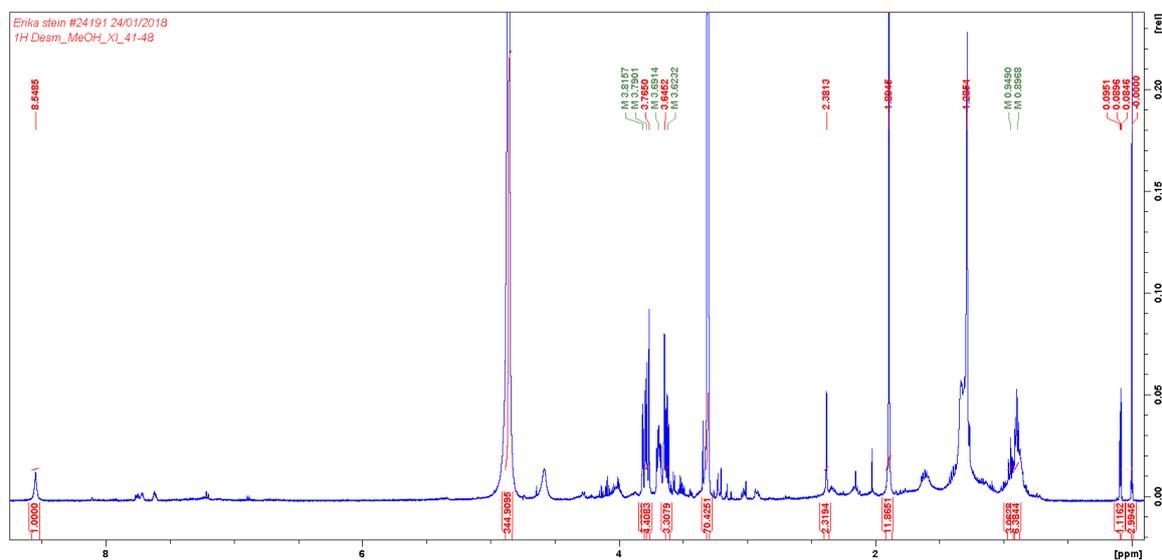


Figura 18. Espectro de Ressonância Nuclear Magnética de ^1H das frações reunidas D-MeOH-XI- 41-49 (500 MHz, MeOD).

5.3.4.2. Determinação da estrutura e caracterização do manitol

Foram isolados 17,5523 g de substância incolor, cristalizada, a partir de 33,4516 g do extrato metanólico da macroalga, ou seja, os cristais consistiam em 52,47% do extrato. A figura 19 mostra o espectro de infravermelho dessa substância (A). Esses cristais foram lavados com heptano.

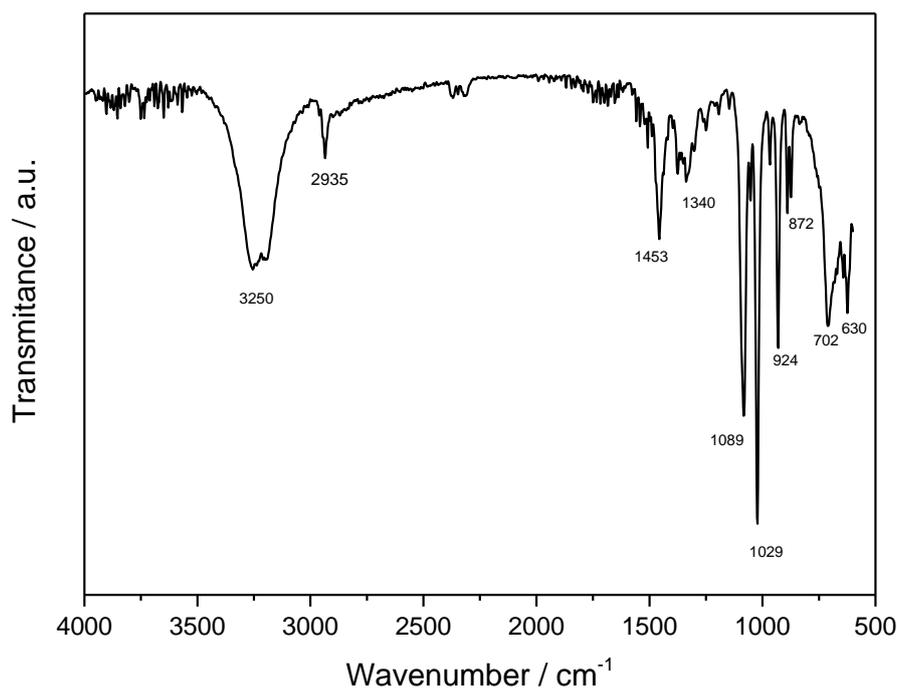


Figura 19. Espectro de Infravermelho da substância (A).

Neste espectro, nota-se a ausência de grupo carbonila (região entre $1600 - 1750 \text{ cm}^{-1}$). Na tabela 6 estão dispostas as absorções observadas neste espectro.

Tabela 6. Absorções na região do infravermelho, características de grupos funcionais** e absorções observadas no espectro do cristal isolado do extrato metanólico de *Desmaretia menziesii*.

	Absorções de estiramento cm^{-1}	Absorções de deformação cm^{-1}	Absorções observadas cm^{-1}
C-H de alcanos:	2.962 - 2.853	~ 1.340	2.935; 2.340
C-H ₂	1.484 - 1.445	722	1.453; 702
O-H (em associação)	3.400 - 3.200	~ 1.050	3.250; 1.089*
C-O	1.350 - 1.260	~ 1.050	1.340; 1.029*

* os valores 1.340 e 1.029 podem ser intercambiáveis; **Dyer, 1965.

Também foram notadas as ausências de absorções devidas a grupos aromáticos e a carbonos sp^2 e sp . Dessas observações pode-se inferir que a molécula em estudo possui grupo hidroxila ligado a cadeia hidrocarbônica formada por carbonos sp^3 . Também que na molécula podem existir grupos C-H (metínicos) e C-H₂ (metilênicos), além de O-H (hidroxila).

A figura 19 mostra o espectro de RMN de ^1H da substância (A).

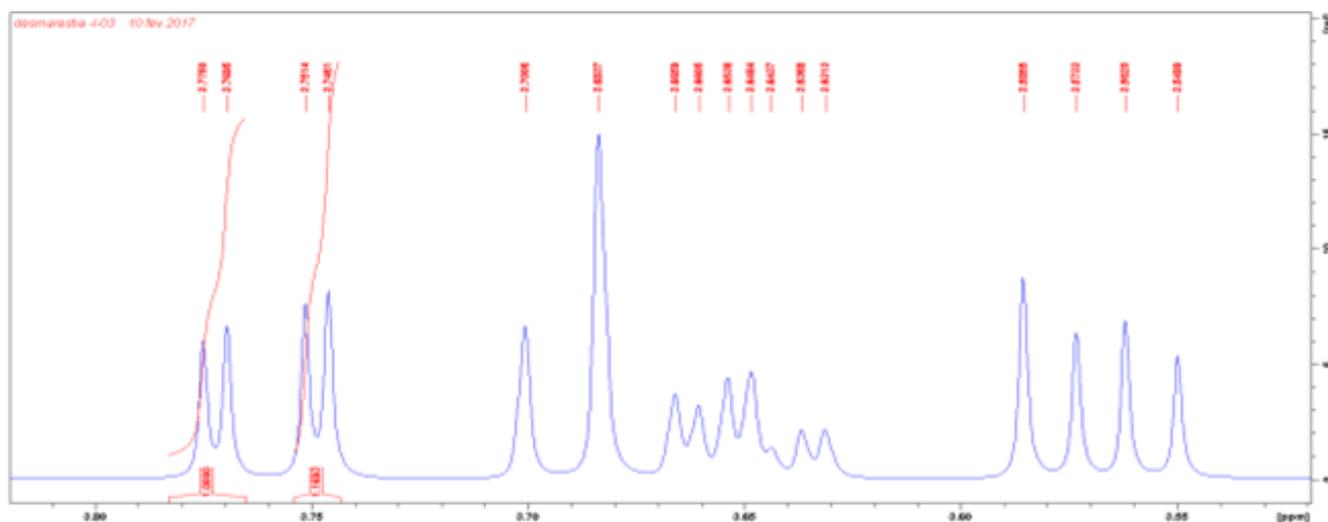


Figura 20. Espectro de RMN de ^1H da substância (A) (H_2O) (500 MHz, CDCl_3).

Este espectro mostra quatro grupos de sinais emitidos por hidrogênios ligados a carbonos sp^3 que por sua vez estão ligados a grupos hidroxila: são dois duplos dupletos, um em δ_{H} 3,56 ($J=16$ e 6 Hz) e outro em δ_{H} 3,78 ($J=14$ e 3,4 Hz); um dupleto de duplo dupleto em δ_{H} 3,66 ($J=16$, 7 e 3 Hz) e um dupleto em 3,69 ($J=9$ Hz). A figura 21 mostra o espectro de RMN de ^{13}C da substância (A).

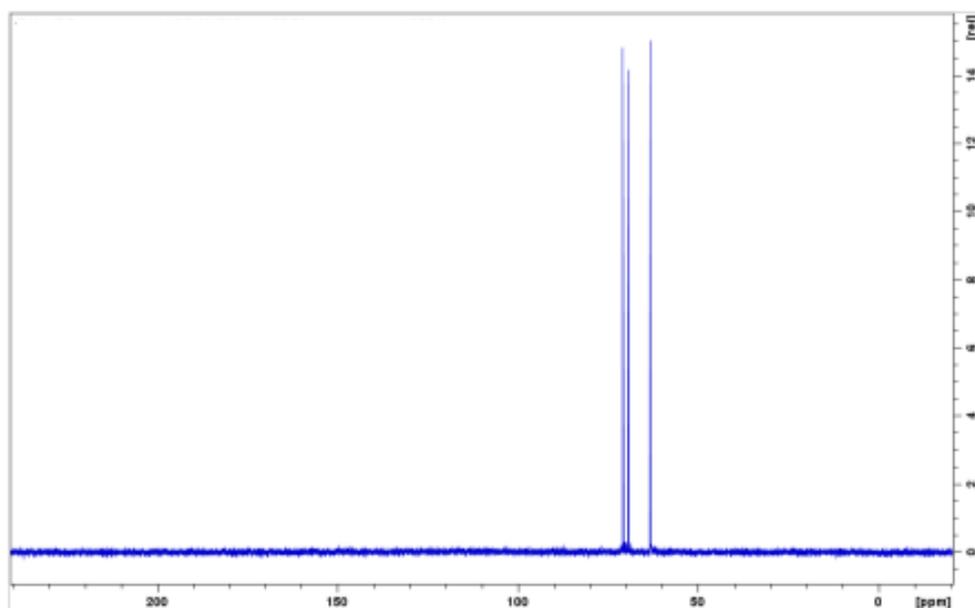


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C da substância (A) (125 MHz, CDCl_3).

No espectro de RMN de ^{13}C existem três sinais de carbonos sp^3 e nenhum grupo carbonílico (ausência do sinal entre 160-200 ppm); por seu deslocamento, é possível inferir que esses carbonos não pertencem às funções ácido, éster, cetona ou aldeído, porém que estão

vizinhos a átomo de oxigênio. O espectro de infravermelho indica a presença de grupo hidroxila: os três sinais que aparecem entre 63,18 ppm e 70,7 ppm estão em concordância com sinais de carbonos ligados a grupo hidroxila. Na figura 22 está o espectro de RMN de HSQC desta substância.

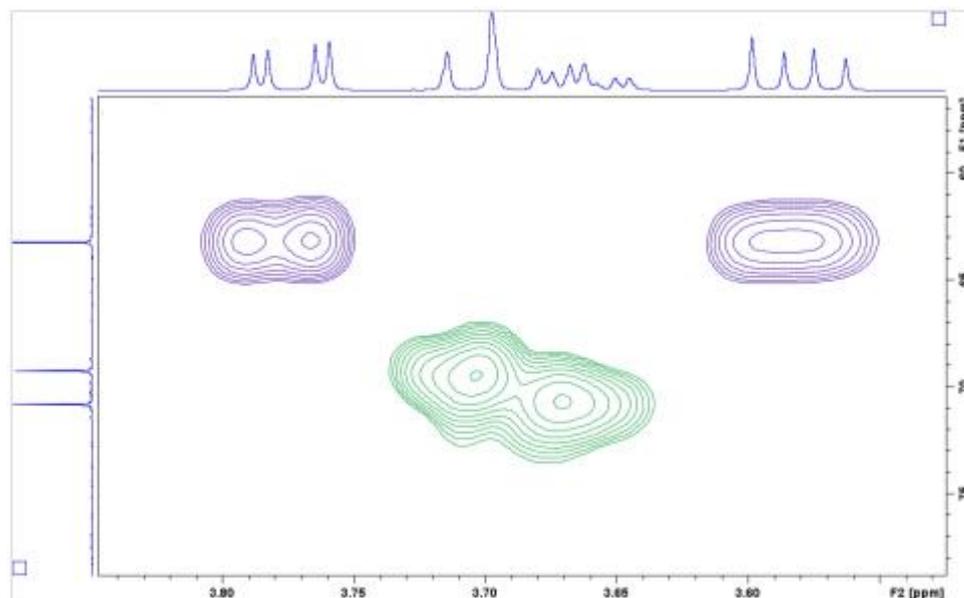


Figura 22. Espectro de HSQC da substância (A).

Este espectro mostra que a molécula é formada por 1 grupo metilênico e dois grupos metínicos. Os deslocamentos químicos dos três carbonos comprovam que todos os três portam grupo hidroxila, sendo, a molécula, um poliálcool. Ou seja, temos um grupo $-CH_2OH$ e dois grupos $-CHOH$. O grupo metilênico é a extremidade de uma cadeia saturada; um dos grupos metínicos é vizinho a esse grupo metilênico (hidrogênios vicinais) e a um grupo metínico, e o terceiro grupo metínico é vizinho a este segundo e à outro grupo metínico, ou seja, não é a outra extremidade da molécula. Ora, isso só é possível se a outra parte da molécula for simétrica.

O espectro de massas da substância mostra que este composto tem um número de carbonos maior do que três e que a massa da molécula m/z 182,172 condiz com a fórmula $C_6H_{14}O_6$ ou seja, exatamente o dobro da massa inferida a partir dos espectros de 1H e ^{13}C RMN.

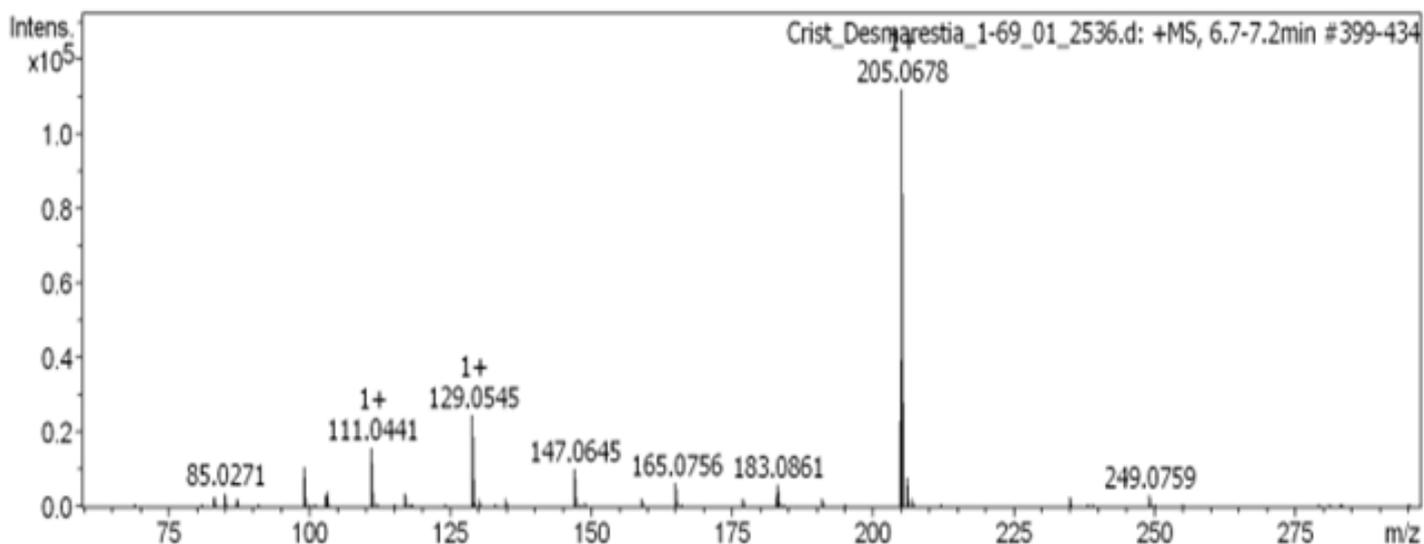
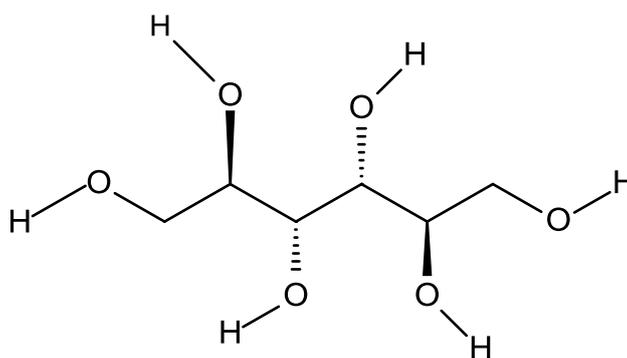


Figura 23. Espectro de massas da substância (A)

Em pesquisa bibliográfica (Hagiwara et al., 2005; Moreira, 2009), pode-se comprovar que a substância é o manitol (24), cuja fórmula é $C_6H_{14}O_6$, e a massa molecular é $M = 182,172$ D. O pico correspondente à massa molecular do manitol aparece em $M^+ = 183,0861$. O pico em m/z 205,0678 corresponde a $(M + Na)^+$. Os picos em m/z 165,0756, 147,0645, 129,0545, 111,0441 são devidos a íons decorrentes da perda de H_2O ($m=18$).



Manitol

Figura 24. Estrutura do manitol (A).

O manitol é um poliol: os polióis têm propriedades muito interessantes. Especificamente, o D-manitol existe em diversas formas cristalinas: Pitkinen et al. (1996) consideraram a existência de sete dessas formas, algumas delas obtidas espontaneamente, por resfriamento de material fundido (162 ± 2 °C). Essas formas foram todas caracterizadas por

espectroscopia Raman e de Infravermelho (Ye & Byron, 2008). Também podem formar hidratos (Yu et al., 1999) e seu ponto de congelamento é de - 117 °C (Gunasekara et al., 2014).

Polióis também têm a capacidade de estocar energia, que depois pode ser liberada para o meio (Del Barrio et al., 2016; Barreneche et al., 2013; Gil et al., 2013; Kumaresan et al., 2011).

Outra propriedade muito importante destes carboidratos é a atividade anti-congelante, devida às suas estruturas moleculares nas quais as distâncias espaciais entre os oxigênios das hidroxilas é de 4,2 a 4,5 Å (Baruch et al., 2008). Tanto insetos quanto plantas superiores que habitam regiões muito frias são protegidos do congelamento por poliálcoois (Robinson, 2001; Roser et al., 1992).

O manitol é considerado, nas algas, regulador osmótico e protetor frente a estresses ambientais, especialmente o hídrico (Tonon et al., 2017). No presente estudo, mais de 50% do extrato metanólico era constituído por manitol. Devido à propriedade de estocar calor (energia), ao seu baixo ponto de congelamento, essa substância poderia estar distribuída por todo o talo exercendo também a função de anticongelante, ou seja, protegendo a alga das baixas temperaturas da região antártica.

5.4 Pigmentos fotossintetizantes

Não houve diferença significativa entre as concentrações da clorofila *a* e dos pigmentos acessórios clorofila *c* e fucoxantina, das regiões estipe, mediana e ápice (Figura 23), o que mostra que a distribuição das clorofilas *a*, *c* e da fucoxantina é uniforme, ao longo do indivíduo. As correlações entre a clorofila *a* e a clorofila *c* são apresentaram uma relação diretamente proporcional significativa, porém as entre a clorofila *a* e a fucoxantina não houve relação significativa, observação que coincide com as de Gómez & Wiencke (1996). Mansilla et al. (2016), estudando espécies do gênero *Desmarestia* da região subantártica e antártica, verificaram que os indivíduos antárticos apresentavam altas concentrações desses pigmentos e que, especialmente em *D. menziessi*, essas altas taxas variaram de acordo com o gradiente latitudinal.

Os dados obtidos nesse trabalho estão de acordo com os apresentados por Mansilla et al., (2016), pois o local de coleta de nosso material, a ilha de Livingston, situa-se geograficamente (latitudes semelhantes) próxima à ilha Deception, um dos locais em que as macroalgas apresentaram taxas elevadas de pigmentos, segundo esse autor.

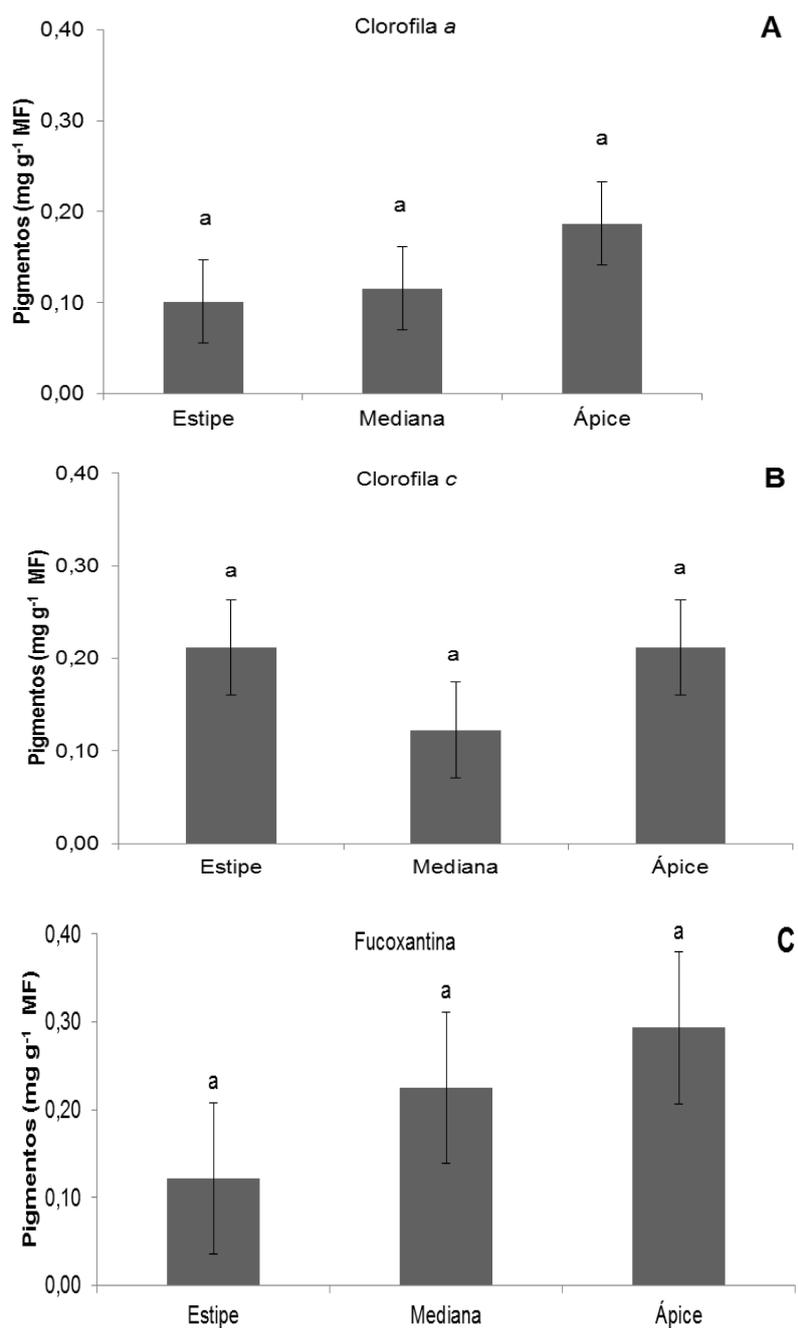


Figura 25. Concentração dos pigmentos fotossintetizantes Cla (A), Clc (B) e Fucoxantina (C) de *Desmarestia menziesii* nas em diferentes regiões do talo. Os valores correspondem à média \pm DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferente entre si, segundo o teste de comparação de múltipla de Student - Newman - Keuls ($p < 0,05$).

5.5 Proteínas solúveis totais

A riqueza de proteínas solúveis totais foi significativamente maior nas regiões do estipe e mediana (Figura 25). Os maiores teores de proteínas apresentados pelo estipe e pela mediana podem ser associados ao padrão de crescimento da alga, pois no gênero *Desmarestia* o crescimento é tricotálico, ou seja, as divisões celulares ocorrem na base (Lobban e Wynne, 1981).

Nossos resultados concordam com os obtidos por Peters et al. (2005) que observaram que os teores de proteínas das espécies antárticas seriam superiores aos das macroalgas das regiões temperadas e tropicais, devido ao fato de o nitrogênio não ser um fator limitante para o desenvolvimento das espécies nessa região glacial. A baixa quantidade de proteínas no ápice dos talos sugere a ação de fatores abióticos, como os raios ultravioletas e a baixa temperatura, que degradam as proteínas (Karsten et al., 2009; Flores-Molina et al., 2016). Por outro lado, Gómez & Wiencke (1998b) estudando as mudanças sazonais da macroalga parda endêmica *Ascoseira mirabilis* observaram o direcionamento das proteínas da região distal (ápice) na forma de aminoácidos para as regiões mediana e base, para impulsionar o crescimento nessas áreas. As observações desses autores aplicam-se aos resultados obtidos em *D. menziesii*.

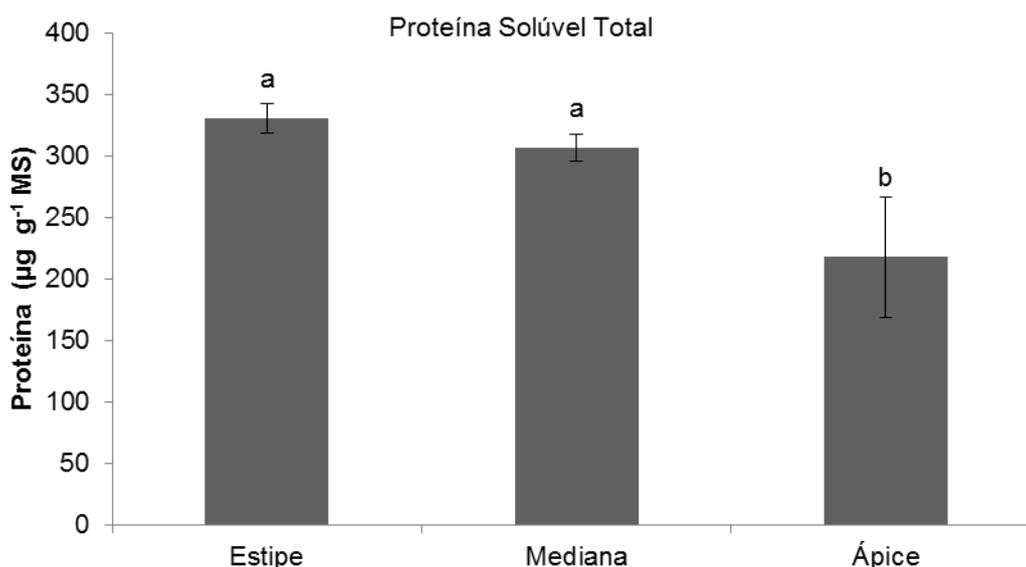


Figura 26. Concentração de proteínas solúveis totais de *Desmarestia menziesii* das regiões estipe, mediana e ápice. Média \pm DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferente entre si, segundo o teste de comparação de múltipla de Student - Newman - Keuls ($p < 0,05$).

5.6 Carboidratos Totais

O teor de carboidratos não variou entre as regiões estipe, mediana e ápice, nas amostras dos extratos aquoso e etanólico, porém houve diferença entre os teores de carboidratos dos extratos aquoso e etanólico, pois o aquoso apresentou maior teor (13 mg g⁻¹ MF e 3 mg g⁻¹ MS, respectivamente) (Figura 25). Essa diferença pode ser decorrente da maior polaridade dos carboidratos mais abundantes e que são os que desempenham funções estruturais, como o alginato, o glucano, o fucoidano (polissacarídeo sulfatado) e o laminarano (açúcar de reserva), abundantes nas algas pardas (Davis et al., 2003). O etanol, de polaridade um pouco menor, teria extraído menor quantidade de açúcares com baixo peso molecular.

Gómez et al., (1998a) em seus estudos sobre carboidratos de *D. menziesii* observaram que o conteúdo de manitol era baixo desde o início até o fim da primavera, mas aumentava sensivelmente no fim do verão enquanto que o de laminarano era alto no início da primavera e permanecia baixo e constante a partir do fim da primavera e durante o verão. Essa relação inversa entre o manitol e o laminarano está associado com a formação de biomassa e alongamento do talo, ocorrendo à assimilação do carbono presente nessas estruturas para as atividades metabólicas.

Entretanto, a quantidade de manitol isolada de *Desmarestia menziesii*, aliada a algumas de suas propriedades físico-químicas, como capacidade de estocar energia (Del Barrio et al., 2016; Barreneche et al., 2013; Gil et al., 2013; Kumaresan et al., 2011) e a atividade anti-congelante (Baruch et al., 2008), fazem supor que esse polioliol tenha também a função de preservar o organismo, em temperaturas muito baixas.

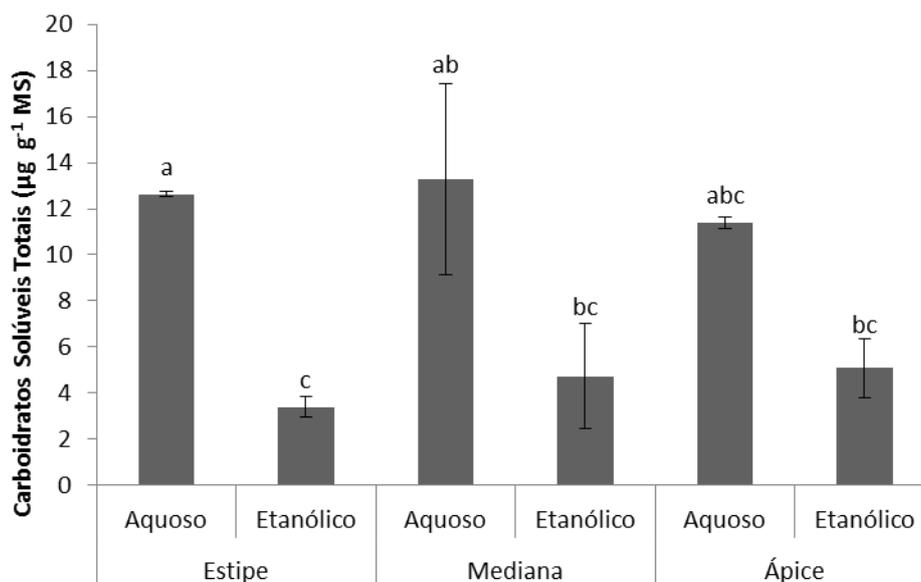


Figura 27. Concentração de carboidratos solúveis totais do extrato aquoso (A) e etanólico (B) juntos das regiões estipe, mediana e ápice. Média \pm DP (n=3). Tratamentos com letras distintas são significativamente diferente entre si, segundo o teste de comparação de múltipla de Student - Newman - Keuls ($p < 0,05$).

A correlação de Pearson entre os metabólitos mostrou que as correlações entre os pigmentos clorofila *a* e clorofila *c* são diretamente proporcionais positiva e que para os demais constituintes estudados (Fuc, Prot, EA e EE) não apresentaram relação significativa ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Tabela 7. Coeficiente de Pearson (r) entre os metabolitos estudados (Cl a = Clorofila a; Cl c = Clorofila c; Fuc = Fucoxantina; Prot = Proteína; EA = Carboidrato extrato aquoso; EE = Carboidrato extrato etanólico). A correlação significativa positiva está representada em vermelho (sendo $p < 0,05$).

	Cl a	Cl c	Fuc	Prot	EA	EE
Cl a	1,000000					
Cl c	0,697608	1,000000				
Fuc	0,572385	-0,126083	1,000000			
Prot	-0,460323	-0,023024	-0,523304	1,000000		
EE	0,105612	0,194414	-0,026256	0,652767	1,000000	
EA	0,069770	-0,507676	0,621946	-0,308045	0,249548	1,000000

6 CONCLUSÃO

- O extrato em diclorometano reagiu positivamente ao derivatizante p-hidroxibenzaldeído (revelador de terpenos); o extrato em acetato de etila apresentou reação positiva ao DDPH (revelador de antioxidantes) e ao teste bioautográfico para detecção de antifúngicos; o extrato metanólico apresentou reação positiva com a ninidrina (aminoácidos e amins). O extrato hexânico não reagiu positivamente a nenhum desses derivatizantes ou testes bioautográficos.

- No extrato hexânico foram identificados o fucosterol, a 5- α -pregn-2-ene-12,20-diona e de numerosas substâncias pertencentes ao metabolismo das macroalgas. Também foram identificados poluentes: ftalatos, adipatos e resíduos de silicone.

- No extrato em diclorometano, foram identificados hidrocarbonetos com cadeias maiores do que C₂₃, tendo, alguns deles, cadeias muito longas, características de hidrocarbonetos de petróleo, além de outros poluentes. Esse achado mostra, pela primeira vez, a extensão do impacto causado pela presença do homem, na região.

- As atividades “antifúngica” e “antioxidante” apresentadas pelo extrato em acetato de etila são devidas ao grupo de substâncias semelhantes que foram separadas, cujos espectros assemelham-se ao dos cromenóis, aos quais ainda não havia sido atribuída nenhuma atividade.

- Do extrato metanólico foi isolada grande quantidade de manitol, substância que ainda não havia sido isolada de *D. menziesii*; essa quantidade, e as propriedades que o manitol possui (armazenamento de calor e ponto de congelamento baixo) leva à suposição de que o manitol pode desempenhar a função de substância anticongelante, também para espécies pardas antárticas.

- Nenhum dos extratos testados, apresentou atividade anticolinesterásica.

- Os pigmentos fotossintetizantes e os carboidratos estão distribuídos uniformemente ao longo do talo; as proteínas solúveis totais, entretanto, apresentam maiores concentrações no estipe e mediana (ou seja, nas regiões mais "velhas", em que o talo é mais grosso e rígido). Essa distribuição das proteínas pode estar associada ao modo de crescimento da espécie (tricotálico) e também a fatores abióticos uma vez que eles direcionam o transporte de proteínas presentes no ápice para regiões inferiores (estipe e mediana), promovendo, desta forma, o crescimento do organismo e garantindo a sua sobrevivência.

- Nossos resultados contribuem para o conhecimento da fisiologia, bioquímica e da química das macroalgas antárticas e também para o do "status quo" do ambiente marinho, que mostra sinais inequívocos de poluição. Também mostra que as macroalgas marinhas podem agir como bioindicadores de poluição, não só com relação aos metais, mas também com relação a todo o tipo de resíduo químico.

7 REFERÊNCIAS

- Abha, S. & Singh, C.S.** 2012. Hydrocarbon Pollution: effects on living organisms, remediation of contaminated environments, and effects of heavy metals co-contamination on bioremediation.p. 185-206. In: (L. Romero-Zerón, ed.) Introduction to enhanced oil recovery (EOR). Processes and bioremediation of oil-contaminated sites. Inteck Europe, Rijeka, Croatia, 318 p.
- Agripino, D.G., Lima, M.E.L., Silva, M.R., Meda, C.I., Bolzani, V.S., Cordeiro, I., Young, M. C. M. & Moreno, P.R.H.** 2004. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA damaging Activities: IN. Atlantic Rain Forest. Ecological Station Juréia-Itatins. Biota Neotropica 4: 15.
- Ahern, T. I. M. J., Katoh, S. & Sadam E.** 1983. “Arachidonic Acid Production by the Red Alga”. XXV: 1057–70p.
- Al-saif, S. S. A., Nevein, A. & Ibrahim A. A.** 2014. “Antibacterial substances from marine algae isolated from Jeddah coast of Red sea , Saudi Arabia”. : 57–64p.
- Amsler, C. D., Iken, K., McClintock, J. B., & Baker, B. J.** 2009. Defenses of polar macroalgae against herbivores and biofoulers. *Botanica Marina*, 52(6), 535–545. <https://doi.org/10.1515/BOT.2009.070>
- Amsler, C. D., & Fairhead, V. A.** 2005. Defensive and Sensory Chemical Ecology of Brown Algae. *Advances in Botanical Research*, 43(C), 1–91. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(05\)43001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(05)43001-3)
- Ananya & Kamal, A.** 2016. “Fatty acid profiling and antioxidant potential of total polar lipid content”. 8(2): 2–6p.
- Ankisetty, S., Nandiraju, S., Win, H., Park, Y. C., Amsler, C. D., McClintock, J. B., ... Baker, B. J.** 2004. Chemical investigation of predator-deterred macroalgae from the Antarctic Peninsula. *Journal of Natural Products*, 67(8), 1295–1302. <https://doi.org/10.1021/np049965c>
- Attokaran, M. & Blackwell. W.** 2017. Natural food flavors and colorants. Second Edition, Hoboken, Series: Institute of food technologists series.

- Arachidonic Acid.** Medical Subject Headings. [Citado em março de 2018]. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68016718>
- Avila, C., Taboada, S., & Núñez-Pons, L.** 2008. Antarctic marine chemical ecology: What is next? *Marine Ecology*, 29(1), 1–71. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0485.2007.00215.x>
- Avio, C.G., Gorbi, S. & Regoli, F.** 2016. Plastics and microplastics in the oceans: From emerging pollutants to emerged threat. *Marine Environmental Research* 1-10. Doi 10.1016/j.marenvres.
- Bai, Z., P Nan., & Y, Zhong.** 2005. Chemical composition of the essential oil of *rhodiola quadrifida* from xinjiang , china. 41(4): 337–38p.
- Barahona, T., Encinas, M.V., Imarai, M., Mansilla, A., Matsuihiro, B., Torres, R., Valenzuela, B.** 2014. Bioactive polysaccharides from marine algae. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre* 4: 125–138.
- Bargagli, R.** 2008. Environmental contamination in Antarctic ecosystems. *Science of the Total Environment*, 400(1–3), 212–226. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.06.062>
- Barreneche, C., Gil, A., Sheth, F., Fernández, A.I. & Cabeza, L.F.** 2013. Effect of D-mannitol polymorphism in its thermal energy storage capacity when it is used as PCM. *Solar Energy* 94: 344–351.
- Baruch, E., Belostotskii, A.M. & Mastai, Y.** 2008. Relationship between the antifreeze activities and the chemical structures of polyols. *Journal of Molecular Structure* 874:170–177
- Bayer-Giraldi, M., Jin, E. & Wilson, P.W.** 2014. Characterization of ice binding proteins from sea ice algae. *Methods on Molecular Biology* 1166:241-53
- Becker, S., Quartino, M. L., Campana, G. L., Bucolo, P., Wiencke, C., & Bischof, K.** 2011. The biology of an Antarctic rhodophyte, *Palmaria decipiens*: recent advances. *Antarctic Science*, 23(5), 1–12. <https://doi.org/10.1017/S0954102011000575>
- Bernardi, J., Vasconcelos, E.R.T.P.P., Lhullier, C., Gerber, T., Colepicolo-Neto, P. & Pellizzari, F. M.** 2016. Preliminary data of antioxidant activity of green seaweeds (Ulvophyceae) from the Southwestern Atlantic and Antarctic Maritime islands. *Hidrobiológica* 26 (2): 233-239.

- Bischof, K., Gómez, I., Molis, M., Hanelt, D., Karsten, U., Lüder, U. & Wiencke, C.** 2007. Ultraviolet radiation shapes seaweed communities. *Life in Extreme Environments*, 2, 187–212. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6285-8-12>
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G. & Prinsep, M.R.** 2014. Marine natural products. *Natural Product Reports* 31: 160-258.
- Blunt, J.W., Copp, B.R., Keyzers, R.A., Munro, M.H.G. & Prinsep, M.R.** 2013. Marine natural products. *Natural Product Reports* 30: 237-323
- Boland, W., Jakoby, K. & Jaenicke, L.** 1982. Synthesis of (\pm) viridiene, the two sperm releasing and attracting pheromones from the brown algae *Desmaretia aculeata* and *Desmaretia viridis*. *Helvetica Chimica Acta* 65(7): 2355-2362.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72:248-254.
- Brooks, C.J.W. & Middleditch, B.S.** 1973. Mass Spectrometry in Steroid Analysis. cap. 6, p. 140-188. In: (Ed. E. Heftmann) *Modern Methods of Steroid Analysis*. Academic Press, New York, 522 p.
- Carvalho, M. A. M., Pinto, M. M. & Figueiredo-Ribeiro, R. C. L.** 1998. Inulin production by *Vernonia herbacea* as influenced by mineral fertilization and time of harvest. *Revista Brasileira de Botânica* 21:275-280
- Chan, H.W., Lau, T.C., Ang, P.O., Wu, M. & Wong, P.K.** 2004. Biosorption of di(2-ethylhexyl) phthalate by seaweed biomass. *Journal of Applied Phycology* 16: 263–274.
- Conserva, G.A.A., Sant’Anna, C.L., Cambui, C.C.N., Brunetti, R.L., Rangel, M., Torres, L.M.B., Young, M.C.M. & Carvalho, L.R.** 2011. Prospecção de atividades toxicológicas e farmacológicas em cepas de cianobactérias da Coleção de Culturas do Instituto de Botânica. [HTTP://www.raibt.net.br/cdraibt2011/Busca.html](http://www.raibt.net.br/cdraibt2011/Busca.html).
- Coppejans, E., Leliaert, F., Dargent, O., Gunasekara, R. & De Clerck, O.** 2009. Sri Lankan seaweeds—methodologies and field guide to the dominant species. *Abc Taxa*, Sri Lanka, Asia, 6(i-viii), 265 p.
- Cyclomethicone 5.** DrugBank. [Citado em março de 2018]. Disponível: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB11244>

- Davis, Thomas A., Bohumil Volesky, & Alfonso Mucci.** 2003. "A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae". *Water Research* 37(18): 4311–30.
- Davyt, D., Enz, W., Manta, E., Navarro, G & Norte, M.** 1997. New chromenols from the brown alga *Desmarestia menziesii*. *Natural Products Letters* 9: 305-321.
- De-Paula, J.C., Cavalcanti, D.N. Yoneshigue-Valentin, Y. & Teixeira, V.L.** 2012. Diterpenes from marine brown alga *Dictyota guineensis* (Dictyotaceae, Phaeophyceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(4): 736-740.
- Del Barrio, E.P., Cadoret, R., Daranlot, J. & Achchaq, F.** 2016. New sugar alcohols mixtures for long-term thermal energy storage applications at temperatures between 70 °C and 100 °C. *Solar Energy Materials & Solar Cells* 155: 454–468
- Dong, W., Tan. L., Zhao, J., Hu, R., & Lu, M.** 2015. "Characterization of Fatty Acid, Amino Acid and Volatile Compound Compositions and Bioactive Components of Seven Coffee (*Coffea robusta*) Cultivars Grown in Hainan Province, China". *Molecules*: 20p.
- Docosahexaenoic Acids.** Medical Subject Headings. [Citado em março de 2018].
Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68004281>
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A.; Smith, F.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28:350-356
- Dunlap, W. C., & Yamamoto, Y.** 1995. Small-molecule antioxidants in marine organisms: Antioxidant activity of mycosporine-glycine. *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and*, 112(1), 105–114. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(95\)00086-N](https://doi.org/10.1016/0305-0491(95)00086-N)
- Durak, D. & Kalender, Y.** 2007. Fine Structure and Chemical Analysis of the Metathoracic Scent Gland of *Eurygaster maura* (Linnaeus, 1758) (Heteroptera: Scutelleridae). *Folia biologica* (Kraków), vol. 55, No 3-4
- Dyer, J.R.** 1965. Espectroscopia no Infravermelho. Cap. 3: 24-60. In: *Aplicações da espectroscopia de absorção aos compostos orgânicos*. Editora Edgard Blucher Ltda, São Paulo, 155 p.

- EAFUS.** Pubchem. [Citado em março de 2018]. Disponível: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
- EWG's Skin Deep - Cosmetics Database/ HMDB/ EAFUS. Pubchem.** [Citado em março de 2018]. Disponível: <https://www.ewg.org/skindeep/#.WqoGEWrwbIU> HMDB. Pubchem. [Citado em março de 2018]. Disponível: <http://www.hmdb.ca/>. Acesso 2018.
- Felicio, R.** 2007. Antártica - Geografia do Continente Gelado e as Operações Brasileiras. *Confins*, (1), 1–30. <https://doi.org/10.4000/confins.122>
- Findlay, J.A. & Patil, A.D.** 1985. Sterol and other constituents of the brown alga *Desmarestia aculeata*. *phytochemistry* 24(2): 366-367.
- Flores-Molina, M. R., Rautenberger, R., Muñoz, P., Huovinen, P & Gómez, I.** 2016. Stress Tolerance of the Endemic Antarctic Brown Alga *Desmarestia anceps* to UV Radiation and Temperature is Mediated by High Concentrations of Phlorotannins. *Photochemistry and Photobiology*. 92: 455–466
- Fraire-Velázquez, S. & Balderas-Hernández, V.E.** 2013. Abiotic Stress in Plants and Metabolic Responses. Cap. 2, 25-48. In: K. Vahdati & C. Leslie (eds.). *Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture*. Intech, doi 10.5772/54859
- Freedman, B.** 2016. Ecological Effects of Environmental Stressors, p. 1-29. In: *Oxford Research Encyclopedia of Environmental Science*. DOI: 10.1093 (environmentalscience.oxfordre.com.).
- Fujii, M. T., Yoneshige-Valentin Y., Pupo D., Guimaraes S. M., Silva I. D., Dalto A. G., Martins A. P., Pereira D. C., Souza J. M., Pereira C. M. P., Mansilla A., Pellizzari F. M. & Colepicolo, P.** (2014). *Macroalgas marinhas da antártica*. 1. ed. São Carlos: CUBO, v. 1. 93 p.
- Garcia, A.N., Stein, E.M., Zambotti-Villela, L., Yokoya, N.S., Colepicolo-Neto, P. & Carvalho, L.R.** 2018. A case study on *Dichotomaria marginata* (Rhodophyta) as a bioindicator for marine pollution. A ser submetido.
- Ghada S. E. Abou-El-Wafaa, G. S. E., Shaabanb, K. A., El-Naggara, M. E. E. & Shaabanb, M.** 2011. Bioactive constituents and biochemical composition of the egyptian brown alga *Sargassum subrepandum* (forsk). *Rev. Latinoamer., Quím*, 39/1-2.

- Gao, D-W & Wen, Z-D.** 2016. Phthalate esters in the environment: A critical review of their occurrence, biodegradation, and removal during wastewater treatment processes. *Science of the Total Environment* 541, 986–1001p.
- Gil, A., Barreneche, C., Moreno, P., Solé, C., Fernández, A.I. & Cabeza, L.F.** 2013. Thermal behaviour of D-mannitol when used as PCM: comparison of results obtained by DSC and in a thermal energy storage unit at pilot plant scale. *Applied Energy* 111: 1107–1113.
- Gomes, A.G. & Azevedo, D.A.** 2003. Aliphatic and Aromatic Hydrocarbons in Tropical Recent Sediments of Campos dos Goytacazes, RJ, Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 14(3): 358-368.
- Gómez, I., Wulff, A., Roleda, M. Y., Huovinen, P., Karsten, U., Quartino, M. L. & Wiencke, C.** 2009. Light and temperature demands of marine benthic microalgae and seaweeds in polar regions. *Botanica Marina*, 52(6), 593–608. <https://doi.org/10.1515/BOT.2009.073>
- Gómez, I.** 2001. Ecophysiology of Antarctic macroalgae: effects of environmental light conditions on photosynthetic metabolism. *Revista Chilena de Historia Natural*. <https://doi.org/10.4067/S0716-078X2001000200004>
- Gómez, I & C Wiencke.** 1998b. Seasonal changes in C, N and major organic compounds and their significance to morpho-functional processes in the endemic Antarctic brown alga *Ascoseira mirabilis*. *Polar Biol.* 19: 115-124
- Gómez, I, G Weykam, & C Wiencke.** 1998a. Photosynthetic metabolism and major organic compounds in the marine brown alga *Desmarestia menziesii* from King George Island (Antarctica) CA128:280907. 60: 105–17. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3770\(97\)00097-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-3770(97)00097-1).
- Gómez, I, e C. Wiencke.** 1997. Seasonal growth and photosynthetic performance of the Antarctic Macroalga *Desmarestia menziesii* (Phaeophyceae) cultivated under fluctuating Antarctic daylengths. *Botanica Acta* 110(1): 25–31.
- Gómez, I, & Wiencke, C.** 1996. Photosynthesis, dark respiration and pigment contents of gametophytes and sporophytes of the antarctic brown alga *Desmarestia menziesii*. *Botanica Marina* 39: 149–57.

- Goodloe, R. S. & Light, R. J.** 1982. Structure and composition of hydrocarbons and fatty acids from a marine blue-green alga, *Synechococcus sp.*. *biochimica et biophysica acta*, 110 (1982) 485-492p.
- Gouveia, V.L.M., Seca, A.M.L., Barreto, M.C. , Neto, A.I., Kijjoo, A. & Silva, A.M.S.** 2013. Cytotoxic meroterpenoids from the macroalga *Cystoseira abies-marina*. *Phytochemistry Letters* 6: 593–597
- Grabarczyk, M., Wińska, K., Mączka, W., Potaniec B. & Aniol, M.** 2015. “Loliolide - the most ubiquitous lactone”. *Folia biologica et oecologica*, 8: 1–8p.
- Graham, L. E., Graham, J. M. & Wilcox, L. W.** 2009. *Algae*. 2º edição. San Francisco, CA: Pearson Benjamin Cummings.
- Graham, L. E. & Wilcox, L. W.** 2000. *Algae*. Prentice Hall.
- Gressler, V., Fujii, M.T., Colepicolo, P. & Pinto, E.** 2012 Characterization of volatile composition of *Laurencia dendroidea* by gas chromatography-mass spectrometry. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22(4): 805-812.
- Guimarães, S. M. P. B.; Crispino, L. M. B. & Nunes, J.M.C.** 2016. *Phaeophyceae*. 1. ed. São Carlos: Rima, v.1. 118p.
- Gupta, S., & Abu-Ghannam, N.** 2011. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds. *Trends in Food Science and Technology*, 22(6), 315–326. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2011.03.011>
- Hagiwara, S., Takahashi, M., Shen, Y., Kaihon, S., Tomiyama, T., Yazawa, M., Tamai, Y., Sin, Y., Kazusaka, A., Terazawa, M.** 2005. A phytochemical in the Edible Tamogi-take mushroom (*Pleurotos cornucopiae*), D-mannitol, inhibits ACE activity and lowers the blood pressure of spontaneously hypertensive rats. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 69(8): 1603-1605.
- Han, J. & Calvin, M.** 1969. Hydrocarbon distribution of algae and bacteria, and microbiological activity in sediments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 64: 436-446.
- Hanley, M. E., Dunn, D. W., Abolins, S.R. & Goulson, D.** 2004. Evaluation of (Z) -9-tricosene baited targets for control of the housefly (*Musca domestica*) in outdoor situations. 128(7): 478–82p.

- Hasanuzzaman, M., Nahar, K. & Fujita, M.** 2013. Extreme Temperature Responses, Oxidative Stress and Antioxidant Defense in Plants. Cap. 6. 169-205. In: K. Vahdati & C. Leslie (eds.). Abiotic Stress - Plant Responses and Applications in Agriculture. Intech, doi. 10.5772/5433.
- Hong, y., Hu, H. Y. & Sagehashi, M.** 2009. Isolation and characterization of antialgal allelochemicals from *Arundo donax* L. Allelopathy Journal 25 (2): 357-368p.
- Hostettmann, K., Queiroz, E.F. & Vieira, P.C.** 2003. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: EdUSPCar, pp. 1-152.
- Hoyer, K., Karsten, U., & Wiencke, C.** 2002. Induction of sunscreen compounds in Antarctic macroalgae by different radiation conditions. Marine Biology, 141(4), 619–627. <https://doi.org/10.1007/s00227-002-0871-0>
- Hoyer, K., Karsten, U., Sawall, T., & Wiencke, C.** 2001. Photoprotective substances in Antarctic macroalgae and their variation with respect to depth distribution, different tissues and developmental stages. Marine Ecology Progress Series, 211, 117–129. <https://doi.org/10.3354/meps211117>
- Jang, K.H., Lee, B.H., Choi, B.W., Lee, H.-S., Shin, J.** 2005. Chromenes from the brown alga *Sargassum siliquastrum*. Journal of Natural Products 68: 716-723.
- Iken, K., Amsler, C. D., Amsler, M. O., McClintock, J. B., & Baker, B. J.** 2009. Field studies on deterrent properties of phlorotannins in Antarctic brown algae. Botanica Marina, 52(6), 547–557. <https://doi.org/10.1515/BOT.2009.071>
- Iken, K., Amsler, C. D., Hubbard, J. M., McClintock, J. B., & Baker, B. J.** 2007. Allocation Patterns of Phlorotannins in Antarctic Brown Algae. Phycologia, 46(4), 386–395. <https://doi.org/10.2216/06-67.1>
- Ishitsuka, M., Kusumi, T., Nomuta, Y, Konno, T & Kakisawa, H.** 1979. New geranylgeranyl benzoquinone derivatives from *Sargassum tortile*. Chemistry Letters: 1269-1272.
- Kain, J. M.** 1989. The seasons in the subtidal. British Phycological Journal, 24(3), 203–215. <https://doi.org/10.1080/00071618900650221>

- Kamenarska¹, Z., Ivanova, A., Stancheva, R., Stoyneva, M., Stefanov¹, K., Dimitrova-Konaklieva, S., & Popov¹, S.** 2006. *Botanica Marina* 49: 47–56p.
- Karabay-Yavasoglu. N. U., Sukatar, A., Ozdemir, G & Horzum, Z.** 2007. Antimicrobial Activity of Volatile Components and Various Extracts of the Red Alga *Jania rubens*. *Phytotherapy research*, 21, 153–156.
- Karsten, U., Wulff, A., Roleda, M. Y., Müller, R., Steinhoff, F. S., Fredersdorf, J., & Wiencke, C.** 2009. Physiological responses of polar benthic algae to ultraviolet radiation. *Botanica Marina*, 52(6), 639–654. <https://doi.org/10.1515/BOT.2009.077>
- Karsten, U., Barrow, K., Nixdorf, O., & King, R.** 1996. The Compability with Enzyme Activity of Unusual Organic Osmolytes from Mangrove Red Algae. *Australian Journal of Plant Physiology*, 23(5), 577. <https://doi.org/10.1071/PP9960577>
- Karsten, U., Wiencke, C. & Kirst, G. O.** 1990. The β -dimethylsulphoniopropioiiate (DMSP) Content of Macroalgae from Antarctica and Southern Chile. *Botanica Marina* 33(2): 143–46.
- Kerr, R.G. & Baker, B.J.** 1991. Marine Sterols. *Natural Product Reports* 8: 465- 497.
- Kharkwal, H., Joshi, D., Panthari, P., Manish, K.P. & Kharkwal, A.C.** 2012. Algae as future drugs. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 5(4): 1-4.
- Kim, S.K & Chojnacka, K.** 2015. *Marine Algae Extracts “Processes, Products, and Applications”*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr. 12, 69469 Weinheim, Germany.
- Kirst, G. O., & Wiencke, C.** 1995. Ecophysiology of Polar Algae. *Journal of Phycology*, 31(2), 181–199. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1995.00181.x>
- Kumaresan, G., Velraj, R. & Iniyar, S.** 2011. Thermal analysis of D-mannitol for use as phase change material for latent heat storage. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management* 11: 3044–3048.
- Kusumi, t., Ishitsura, M., Nomura, Y., Konno, T. & Kakisawa, H.** 1979. New farnesylacetone derivatives from *Sargassum micracanthum*. *Chemistry Letters*: 1181-1184.
- Lebar, M. D., Heimbegner, J. L., & Baker, B. J.** 2007. Cold-water marine natural products. *Natural Product Reports*, 24(4), 774. <https://doi.org/10.1039/b516240h>

- Lee, J.I. & Seo, Y.** 2011. Chromanols from *Sargassum siliquastrum* and their antioxidant activity in HT 1080 cells. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 59(6): 757-761.
- Lee, R.E.** 2008. *Phycology*. Cambridge University Press. 547pp
- Lee, R.F. & Loeblich III, A.R.** 1971. Distribution of 21:6 hydrocarbon and its relationship to 22:6 fatty acid in algae. *Phytochemistry* 10: 593- 602.
- Lobban, C.S. & Wynne, M.J.** 1981. *The Biology of seaweeds*, first ed. Blackwell Scientific Publications.
- Lüning, K.** 1990. *Seaweeds. Their environment, biogeography and ecophysiology*. John Wiley, Son, Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, 527 pp.
- Mansilla, A., Méndez, F., Murcia, S., Rodríguez, J. P., Marambio, J., Rosenfeld, S., Yokoya, N. S. & Bischof, K.** 2016. “Adjustment of pigment composition in *Desmarestia* (Desmarestiaceae) species along a sub-Antarctic to Antarctic latitudinal gradient”. *Polar Research* 35(2016): 1–10.
- Martins, R.M., Nedel, F., Fujii, M.T., Pereira, C.M.P., Lund, R.G. & Colepicolo, P.** 2014. Antimicrobial and cytotoxic activities of seaweeds extracts from Antarctica. XLIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil, 17 a 20 de maio de 2014
- Marinha do Brasil.** 2016. *Tratado da Antártica & Protocolo de Madri/ Marinha do Brasil*. Comissão Internacional para os Recursos do Mar. Secretaria da Comissão. - 2ª Edição. Brasília, DF: SECIRM, 2016. 72p.
- Marinho, S. S. R., Ramos, C. J. B., Leite, J. P. G., Teixeira, V. L., Paixão, I. C. N. P., Dal Belo, C. A., Pereira, A. B. & Pinto, A. M. V.** 2017. “Antiviral activity of 7-keto-stigmasterol obtained from green Antarctic algae *Prasiola crispa* against equine herpesvirus 1”. *Journal of Applied Phycology* 29(1): 555–62. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-016-0946-9>.
- Marston, A., Kissling, J. & Hostettmann, K.** 2002. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem anal* 13 (1): 51-54.

- Marques, L. G.** Aminoácidos tipo micosporina: novas metodologias e distribuição em macroalgas da costa brasileira. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo. 164 p.
- Medeiros, A. M.** Diversidade de macroalgas da Baía do Almirantado, ilha. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. 164 p.
- Merck, E.** 1971a. Vanillin - potassium hydroxide for amino acids and amines, no 328. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. Merck, Darmstadt, Germany, pp. 1-68.
- Merck, E.** 1971b. Cerium sulfate – sulfuric acid for steroids. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. Merck, Darmstadt, Germany, pp. 1-68.
- Merck, E.** 1971c. Iron chloride for phenols and hydroxamic acids. Cerium sulfate – sulfuric acid for steroids no 52. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. Merck, Darmstadt, Germany, pp. 1-68.
- Ministério do Meio Ambiente.** 2009. ANTÁRTICA: Um bem comum da humanidade. 69p
- Moles, J., Torrent, A., Alcaraz, M.J., Ruhl, R. & Avila, C.** 2014. Anti-inflammatory activity in selected Antarctic benthic organisms. *Frontiers in Marine Science* 1: 5; DOI 10.3389/mars.2014.00024.
- Mohamed El Hattab, M., Al Easa, H. S. S., Tabaries A., Piovetti, L. & Kornprobst, J.** 2011. Volatile Components of the Phaeophyceae *Hormophysa cuneiformis* Growing Along Qatar Coasts. *Journal of Essential Oil Research*, Vol. 19.
- Montone, R .C., Taniguchi, S., Sericano, J.L., Weber, R.R. & Lara, W.H.** 2001. Determination of polychlorinated biphenyls in Antarctic macroalgae “*Desmarestia* sp”. *Science of the Total Environment* 277: 181–186p.
- Moreira, B.T.** 2009. Bioprospecção do potencial farmacêutico de duas espécies de fungos do solo do cerrado mineiro. Dissertação de Mestrado. Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais, 125 p.
- Morgan-Kiss, R. M., Priscu, J. C., Pockock, T., Gudynaite-Savitch, L., & Huner, N. P. A.** 2006. Adaptation and Acclimation of Photosynthetic Microorganisms to Permanently Cold Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(1), 222–252. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.222-252.2006>

- Myristic Acid.** National Center for Biotechnology Information. [Citado em março de 2018]. Disponível: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68019814/>
- Norris, J. N.** 2010. 94 Smithsonian contributions to botany of Marine Algae of the Middle Gulf Missouri Plains Northern of California: Village Sites Chlorophyta and Phaeophyceae.
- Numata, A., Kanbara, S., Takahashi, C., Fujiki, R., Yoneda, M., Usami, Y., Fujita, E.** 1992. A cytotoxic principle of the brown alga *Sargassum tortile* and structures of chromenes. *Phytochemistry* 31(4):1209-1213.
- Nuñez-Pons, L. & Avila, C.** 2014. Deterrent activities in the crude lipophilic fractions of Antarctic benthic organisms: chemical defenses against keystone predators. *Polar Research* 33: 21624-21636; DOI 10.3402/polar.v33.21624.
- Paternostro, A. M.** Avaliação do potencial biotecnológico de macroalgas marinhas. Tese de doutorado. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP. 199 p.
- Pasqualetti, C. B.** Análise de pigmentos, proteínas solúveis e carboidratos em espécies de Rhodophyta das regiões antártica e subantártica. Dissertação de mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente. 102 p.
- Parish, T. R., & Bromwich, D. H.** 1991. Continental-Scale Simulation of the Antarctic Katabatic Wind Regime. *Journal of Climate*. [https://doi.org/10.1175/1520-0442\(1991\)004<0135:CSSOTA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1175/1520-0442(1991)004<0135:CSSOTA>2.0.CO;2)
- Pavia, H., Cervin, G., Lindgren, A., & Åberg, P.** 1997. Effects of UV-B radiation and simulated herbivory on phlorotannins in the brown alga *Ascophyllum nodosum*. *Marine Ecology Progress Series*, 157, 139–146. <https://doi.org/10.3354/meps157139>
- Percot, A., Aysel, V., Erduğan, H. & Dural, B.** 2009. “Loliolide in marine algae Loliolide in marine algae”. *Natural product research*, 23:5, 460-465, DOI: 10.1080/14786410802076069.
- Pereira, C.M.P., Nunes, C.F.P., Zambotti-Villela, L., Streit, N.M., Dias, D., Pinto, E., Gomes, C.B. & Colepícolo, P.** 2017. Extraction of sterols in brown macroalgae from Antarctica and their identification in liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Applied Phycology* 29(2): 751-757.

- Peres, J. C. F., Carvalho, L. R., Gonzalez1 E., Berian, L. O. S. & Felicio J. D.** 2012. Evaluation of antifungal activity of seaweed extracts. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, v. 36, n. 3, p. 294-299p.
- Peters, K. J., Amsler, C. D., Amsler, M. O., McClintock, J. B., Dunbar, R. B., & Baker, B. J.** 2005. A comparative analysis of the nutritional and elemental composition of macroalgae from the western Antarctic Peninsula. *Phycologia*, 44(4), 453–463. [https://doi.org/10.2216/0031-8884\(2005\)44\[453:ACAOTN\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2216/0031-8884(2005)44[453:ACAOTN]2.0.CO;2)
- Pharmacology from NCIit.** Nacional Cancer Institute. [Citado em março de 2018]. Disponível: https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C61873/
- Pharmacology from NCIit.** Nacional Cancer Institute. [Citado em março de 2018]. https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&ns=NCI_Thesaurus&code=C68426/
- Pharmacology from NCIit.** HMDB. Pubchem. [Citado em março de 2018]. Disponível: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnavigation.cfm?rpt=eafuslisting>.
- Pharmacology from NCIit.** Pubchem. [Citado em março de 2018]. Disponível: <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnavigation.cfm?rpt=eafuslisting>.
- Physical Description from CAMEO Chemicals.** Cameo chemicals. [Citado em março de 2018]. Disponível: <https://cameochemicals.noaa.gov/chemical/17122>
- Pitkinen, I., Perkkalainen, P. & Rautiainen, H.** 1993. Thermoanalytical studies on phases of D-mannitol. *Thermochimica Acta*, 214: 157-162.
- Ramasamy, V., & Gopalakrishnan, V.K.** 2013. “International Journal of Pharmaceutical and Chemical Composition of Spirulina by Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrophotometer (GC-MS)”. 3(3): 239–44p.
- Renukadevi, K. P., Saravana, P. S. & Angayarkanni, J.** 2011. Antimicrobial and antioxidant activity of *Chlamydomonas reinhardtii sp.* *IJPSR*, 2011; Vol. 2(6): 1467-1472p.
- Rhee, I.K., Van de Meent, M., Ingkaninan, K. & Verpoorte, R.** 2001. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from amaryllidaceae using silica gel thin-layer

- chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A* 915 (1-2): 217-223.
- Renzanka, T., Zahradník, J., & Podojil, M.** 1982. Hydrocarbons in Green and Blue-Green Algae. *Folia Microbiol.* 27, 450-454.
- Rivera, P., Podestá, F., Norte, M., Cataldo, F. & González, A. G.** 1990. New plastoquinones from the brown alga *Desmarestia menziesii*. *Canadian Journal of Chemistry* 68:1399-13400.
- Robinson, C.H.** 2001. Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist* 151: 341–353.
- Rocha, P. O., De Felício, R., Rodrigues A. H. B., L., Ambrósio, D. L., Cicarelli, R. M. B., De Albuquerque, S., Young, M. C. M., Yokoya, N. S. & Deboni, H. M.** Chemical Profile and Biological Potential of Non-Polar Fractions from *Centroceras clavulatum* (C. Agardh) Montagne (Ceramiales, Rhodophyta). 2011. *Molecules.* 16, 7105-7114; doi:10.3390/molecules16087105
- Roser, D.J., Melick, D.R., Ling, H.U. & Seppelt, R.D.** 1992. Polyol and sugar content of terrestrial plants from continental Antarctica. *Antarctic Science* 4 (4): 413-420.
- Gunasekaraa, S. N., Chiua, R. P. J. N. & Martina, V.** 2014. Polyols as phase change materials for low-grade excess heat. *Energy Procedia* 61 (2014) 664 – 669p.
- Schloss, I. R., Ferreyra, G. A., & Ruiz-Pino, D.** 2002. Phytoplankton biomass in Antarctic shelf zones: A conceptual model based on Potter Cove, King George Island. *Journal of Marine Systems*, 36(3–4), 129–143. [https://doi.org/10.1016/S0924-7963\(02\)00183-5](https://doi.org/10.1016/S0924-7963(02)00183-5)
- Schlumpfa, M, Schmidb, P., Durrera, S., Consciencea, M., Maerkela, K., Henselera, M., Gruettera, Herzoga, I., Reolona, S., Ceccatellia, R., Faassa, O., Stutzb, E., Jarryc, H., Wuttkec, W. & Lichtensteigera, W.** 2004. Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters—an update. *Toxicology* 205: 113–122.
- Schoenrock, K. M., Schram, J. B., Amsler, C. D., McClintock, J. B., & Angus, R. A.** 2014. Climate change impacts on overstory *Desmarestia* spp. from the western Antarctic Peninsula. *Marine Biology*, 162(2), 377–389. <https://doi.org/10.1007/s00227-014-2582-8>

- Schories, D. & Kohlberg, G.** 2016. Marine Wildlife, King George Island, Antarctica. Dirk Schories Publications, 348 pp.
- Seely, G .R., Duncan, M. J. & Vidaver W. E.**1972. Preparative and analytical extraction of pigments from brown algae with dimethyl sulfoxide. *Marine Biology* 12, 184—188p.
- Sharma, O.P.** 2011. Series on diversity of microbes and cryptogams - Algae. XV. Tata McGraw Hill, New Delhi, India, 389 p.
- Sevak, H.P., Amsler, C.D., McClintock, J.B., Aumack, C.F., Peters, K.J. & Baker, B.J.** 2012. Algicidal activity and potencial antifouling defenses in macroalgae from the western Antarctica Peninsula including probable synergistic effects of multiple compounds. *Botanica Marina* 55: 311-315; DOI 10.1515/bot-2012-0111.
- Sivakumar, K., Kannappan, S., Dineshkumar, M.,& Patil, K. M.** 2014. Evaluation of marine macro alga, *Ulva fasciata* against bio-luminescent causing *Vibrio harveyi* during *Penaeus monodon* larviculture. *African Journal of Microbiology Research*, 19: 803-813. DOI: 10.5897/AJMR2013.6233
- Sonani, R. R., Rastogi, R. P., & Madamwar, D.** 2017. Natural Antioxidants From Algae. *Algal Green Chemistry*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.00005-9>
- Stavis, P. S.** 1964. *J. Chromatog.* 14, 269.
- Sugisawa, H., Nakamura, H. K. & Tamura H.** 2009. The Aroma profile of the volatiles in marine green algae (*Ulva pertusa*). *Food Reviews International*, ISSN: 8755-9129 (Print) 1525-6103p.
- Țigănuș, D., Coatu, V., Lazăr, L. & Oros, A.** 2016. Present level of petroleum hydrocarbons in seawater associated with offshore exploration activities from the Romanian black sea sector. *Cercetări Marine* 46: 98-108.
- Tonon, T., Li, Y. & McQueen-Mason, S.** 2017. Mannitol biosynthesis in algae: more widespread and diverse than previously thought. *New Phytologist* 213: 1573–1579.
- Trebst, A.** 1978. Plastoquinones in Photosynthesis. *Philosophical Transactions of The Royal Society B* 284: 591-599.

- TSCA.** Pubchem. [Citado em março de 2018]. Disponível: <https://www.epa.gov/chemicals-under-tsca>.
- Vasconcelos, A.G., Araújo, K.V. & Santana, L.A.B.** 2015. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. *Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde* 2015: 27-51.
- Xhaufaire, E., Macarenko, E., Denooz, R., Charlier, C. & Piérard, G. E.** 2008. Skin protection creams in medical settings: successful or evil?. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*, 3:15p. doi:10.1186/1745-6673-3-15
- Weykam, G., Gómez, I., Wiencke, C., Iken, K., & Klöser, H.** 1996. Photosynthetic characteristics and C:N ratios of macroalgae from King George Island (Antarctica). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 204(1–2), 1–22. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(96\)02576-2](https://doi.org/10.1016/0022-0981(96)02576-2)
- Wiencke, C. & Bischof, K.** 2012. *Seaweed Biology. Novel Insights into Ecophysiology, Ecology and Utilization.* Springer-Verlag, Berlim. 510p.
- Wiencke, C., Clayton, M. N., Gómez, I., Iken, K., Lüder, U. H., Amsler, C. D., ... Dunton, K.** 2007. Life strategy, ecophysiology and ecology of seaweeds in polar waters. *Life in Extreme Environments*, 213–244. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6285-8-13>
- Wiencke, C., M. N. Clayton, & D. Schulz.** 1995. “Life History, Reproductive Morphology and Development of the Antarctic Brown Alga *Desmarestia menziesii* J. Agardh”. *Botanica Acta* 108(3): 201–8.
- Wiencke, C.** 1990. Seasonality of brown macroalgae from Antarctica—a long-term culture study under fluctuating Antarctic daylengths. *Polar Biology*, 10(8), 589–600. <https://doi.org/10.1007/BF00239370>
- Wiencke, C.** 1989. Temperature requirements for growth and temperature tolerance of macroalgae endemic to the Antarctic region. *Marine ecology-progress series*, 54, 189–197. <https://doi.org/10.3354/meps054189>
- Yamamoto, M., Baldermann, S., Yoshikawa, K., Fujita, A., Mase, N. & Watanabe, N.** 2014. Determination of Volatile Compounds in Four Commercial Samples of Japanese Green Algae Using Solid Phase Microextraction Gas Chromatography Mass

Spectrometry. Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal. 289780, 8 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/289780>

Ye, P. & T. Byron. 2008. Characterization of D-mannitol by thermal analysis, FTIR, and Raman spectroscopy. *American Laboratory* 40(14): 24-27.

Yu, L., Milton, N., Groleau, E.G., Mishra, D.S. & Vansickle, R.E. 1999. Existence of a mannitol hydrate during freeze-drying and practical implications. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88(2): 196-198.

Zacher, K., Rautenberger, R., Hanelt, D., Wulff, A., & Wiencke, C. 2009. The abiotic environment of polar marine benthic algae. *Botanica Marina*, 52(6), 483–490.
<https://doi.org/10.1515/BOT.2009.082>