

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS MACAÉ**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E CONSERVAÇÃO**

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE QUÍMICA E DO POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO DE MACROALGAS MARINHAS DE ECOSISTEMAS
ANTÁRTICOS**

CAROLINA LUCÍA VICTORIA ROSAS FERNÁNDEZ

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação da Universidade Federal de Rio de Janeiro, Campus Macaé, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Orientadora: Angélica Ribeiro Soares
Co-orientadora: Michelle Frazão Muzitano

Rio de Janeiro
Abril 2020

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE QUÍMICA E DO POTENCIAL
BIOTECNOLÓGICO DE MACROALGAS MARINHAS DE ECOSISTEMAS
ANTÁRTICOS**

CAROLINA LUCÍA VICTORIA ROSAS FERNÁNDEZ

Orientadora: Angélica Ribeiro Soares
Co-orientadora: Michelle Frazão Muzitano

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, *Campus* UFRJ-Macaé Professor Aloísio Teixeira, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Aprovada por:

Presidente, Profa. Dra. Angélica Ribeiro Soares

Profa. Dra. Lisia Mônica de Souza Gestinari

Prof. Dr. Ricardo Moreira Borges

Macaé – RJ
Abril de 2020

R789 Rosas Fernández, Carolina Lucía Victoria
Avaliação da diversidade química e do potencial biotecnológico de macroalgas marinhas de ecossistemas antárticos / Carolina Lucía Victoria Rosas Fernández. -- Rio de Janeiro, 2020. 106 f.

Orientadora: Angélica Ribeiro Soares. Coorientadora: Michelle Frazão Muzitano. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé Professor Aloísio Teixeira, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, 2020.

1. Macroalgas marinhas. 2. Antártica. 3. Atividade antimicobacteriana. 4. Atividade anticancerígena. I. Ribeiro Soares, Angélica, orient. II. Frazão Muzitano, Michelle, coorient. III. Título.

*“La imaginación es más importante
que el conocimiento. El conocimiento
es limitado, la imaginación rodea el
mundo”.*

Albert Einstein

DEDICATORIA

À minha grande e numerosa família, porque cada um de vocês trouxe grandes lições para minha vida e me ajudaram na grande tarefa de afrontar a sociedade. Agradeço-lhes por tudo, porque mesmo de longe sempre estiveram presentes na evolução e no desenvolvimento total da minha dissertação, amo vocês.

Aos meus pais, por terem me forjado como a pessoa que sou hoje; muitas das minhas conquistas devo a vocês, incluindo esta. Me moldaram com regras e algumas liberdades, mas no final de tudo, constantemente me motivaram a alcançar meus sonhos. Porque sempre acreditaram em mim, mesmo quando eu não acreditava. Porque me ensinaram a nunca desistir, que pode haver momentos difíceis, mas que existe uma solução para tudo. Obrigado mãe e pai.

Aos meus irmãos Hugo, Andrés, Ricardo e Sofi, que mesmo à distância sempre encontram uma maneira de rir juntos; e a Mariana e o Carlos, pelo apoio que sempre me deram dia a dia nesses dois anos. A todos, por tornar meus dias mais felizes, porque sei que sempre posso contar com você, porque, apesar da distância e das brigas que podemos ter, estaremos sempre juntos.

Para meu companheiro e o grande amor da minha vida, sua ajuda foi essencial, você sempre esteve comigo mesmo nos momentos mais turbulentos, por me motivar e me ajudar tanto quanto o seu alcance permitisse. Porque quando você descobriu que estaríamos distantes, você foi o primeiro a me apoiar em seguir meus sonhos. Por me acompanhar e me encorajar a seguir meus sonhos todo dia, mesmo estando tão longe um do outro. Pelas maiores aventuras que compartilhamos nos últimos dez anos das nossas vidas e pelas maiores alegrias da minha vida. Eu realmente aprecio isso, Amo você meu amor!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que permite todas as coisas que têm de acontecer, e as que não, também, mas que sempre põe no meu coração a força da qual preciso.

À minha querida orientadora, Profa. Dra. Angélica Soares, porque mesmo antes de me conhecer, confiava em mim e me deu a oportunidade de vir a trabalhar com você. Obrigada por tudo que você me ensinou e por acreditar em mim, porque cheguei sabendo pouco, mas você nunca me deixou, estarei eternamente grata, pela sua paciência comigo, seu carinho, sua confiança, por ser minha mestra e meu modelo, por ter sido como minha segunda mãe aqui no Brasil. Se hoje obtive essa conquista, uma das grandes responsáveis foi você. Serei eternamente grata.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Michelle Frazão Muzitano, por me receber e contribuir para a realização do meu sonho, pela dedicação, disponibilidade e paciência. Obrigada por tudo, você foi essencial na construção, execução e consolidação deste trabalho, aprendi demais com você.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao PPG-CiAC, pela concessão da bolsa que possibilitou minha dedicação exclusiva ao trabalho e a oportunidade de realizar este projeto.

A todos os professores que têm me ajudado e proporcionado todo o ensinamento que contribuiu na formação deste trabalho.

À minha professora e amiga, Nathalia Nocchi, porque você foi meu mestre desde o primeiro dia que entrei no laboratório e com muita paciência me ensinou todas as coisas que precisei para realizar meu projeto.

A todos os meus amigos de mestrado e do laboratório ao longo desse tempo, Juliana, Keila, Ellen, Laura, Thaís e Samyr. Obrigada por todos os momentos maravilhosos que vivemos juntos, conversas e conselhos que compartilhamos. Foram muitas risadas, aprendizado e piadas internas, com certeza a presença de vocês foi essencial para realização deste trabalho.

À todas as minhas amigas de graduação, em especial a Kelly, Yuli, Naysha, Dani e Ceci. Obrigada por todos os momentos maravilhosos, obrigada pelo que vocês foram, são e serão na minha vida.

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, torcendo para que tudo desse certo!

Muito Obrigada!

RESUMO

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE QUÍMICA E DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MACROALGAS MARINHAS DE ECOSISTEMAS ANTÁRTICOS

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação da Universidade Federal de Rio de Janeiro – UFRJ, Campus Macaé, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

A Antártica é um continente caracterizado por condições climáticas extremas e, devido a isso, as algas que habitam esse ambiente desenvolveram diversos mecanismos de sobrevivência, principalmente a produção de substâncias bioativas. No entanto, poucos são os estudos sobre investigação farmacológica de macroalgas marinhas da Antártica. O objetivo desse trabalho foi avaliar a diversidade química e o potencial antimicobacteriano e anticancerígeno de macroalgas marinhas coletadas em diversos locais da Península Antártica. A atividade antimicobacteriana dos extratos e frações foi avaliada contra às cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv e M299, assim como a ação imunomoduladora e citotóxica utilizando macrófagos da linhagem RAW 264.7. Os resultados demonstram que 62,1% dos extratos apresentaram atividade contra a cepa H₃₇Rv e 31% contra a cepa hipervirulenta M299. Seis amostras com atividade frente às duas cepas e índice de seletividade maior que 10 foram selecionadas como promissoras. A atividade anticancerígena dos extratos foi avaliada contra a linhagem celular HCT-116 (câncer de cólon). Dos 27 extratos analisados, 53,9% apresentaram atividade inibitória acima de 75% nas duas concentrações testadas (50 µg/mL e 5 µg/mL) e 15,38 % apresentaram taxa inibitória acima de 50% na menor concentração. Os extratos das macroalgas marinhas *Desmarestia anceps* (Ilha Pinguim) e *Curdiea racovitzae* (Punta Plaza) foram selecionados para o isolamento e identificação de substâncias bioativas, levando em consideração sua atividade biológica e a disponibilidade em massa. O análise do perfil químico, permitiu sugerir a presença de ácidos graxos, esteróis e terpenos nas amostras e frações mais promissoras. Os resultados obtidos demonstram o grande potencial biotecnológico das macroalgas marinhas da Antártica, sendo uma fonte de substâncias para o desenvolvimento de novas terapias antituberculose e anticâncer.

Palavras-chave: Macroalgas marinhas, Antártica, atividade antimicobacteriana, atividade anticancerígena.

ABSTRACT

**EVALUATION OF CHEMICAL DIVERSITY AND THE BIOTECHNOLOGICAL
POTENTIAL OF MACROALGAE OF ANTARCTIC ECOSYSTEMS**

Abstract da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação da Universidade Federal de Rio de Janeiro – UFRJ, Campus Macaé, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Antarctica is a continent characterized by extreme climatic conditions. Due to this, the algae that inhabit this environment have developed several survival mechanisms, mainly the production of bioactive substances. However, there are few studies on pharmacological investigation of Antarctic marine macroalgae. This work aimed to evaluate the chemical diversity and the antimycobacterial and anticancer potential of seaweeds collected in different sites in the Antarctic Peninsula. The antimycobacterial activity of extracts and fractions was evaluated against *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv and M299 strains, as well as the immunomodulatory and cytotoxic activity using RAW 264.7 macrophages. The results show that 62.1% of the extracts showed antimycobacterial activity against the H₃₇Rv strain and 31% against the M299 hypervirulent strain. Six samples with activity against the two strains and a selectivity index greater than 10 were selected as promising. The anticancer activity of the extracts was evaluated against the cell line HCT-116 (colon cancer). Of 27 extracts analyzed, 53.9% showed inhibitory activity above 75% in the two concentrations tested (50 µg/mL and 5 µg/mL) and 15.38% presented an inhibitory rate above 50% in the lowest concentration. The extracts of the seaweeds *Desmarestia anceps* (Penguin Island) and *Curdiea racovitzae* (Punta Plaza) were selected for the isolation and identification of bioactive substances, considering their biological activity and mass availability. The analysis of the chemical profile, allowed to suggest the presence of fatty acids, sterols and terpenes in the most promising samples and fractions. The results obtained demonstrate the great biotechnological potential of Antarctic seaweeds, being a source of substances for the development of new anti-tuberculosis and anticancer therapies.

Keywords: Seaweeds, Antarctica, antimycobacterial activity, anticancer activity.

SUMARIO

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
ÍNDICE DE TABELAS	XV
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	XVII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. PRODUCTOS NATURALES.....	1
1.2. PRODUTOS NATURAIS MARINHOS.....	1
1.3. MACROALGAS MARINHAS.....	3
1.4. ANTÁRTICA.....	4
1.4.1. MACROALGAS ANTÁRTICA.....	7
1.5. TUBERCULOSE.....	10
1.6. CÂNCER.....	13
2. OBJETIVOS	16
2.1. OBJETIVO GERAL.....	16
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
CAPÍTULO I	17
ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E EFEITOS IMUNOMODULATÓRIOS BASEADOS NA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO DE MACROALGAS	
CAPÍTULO II	43
ATIVIDADE ANTICANCERÍGENA DE MACROALGAS MARINHAS ANTÁRTICAS	
CAPÍTULO III	56
DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE MACROALGAS MARINHAS DA ANTÁRTICAS MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS	

CONCLUSÕES.....	90
REFERÊNCIAS.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figure 1.** CGMS chromatograms of promising seaweed samples.....29
- Figura 2.1.** Gráfico em barras representando a quantidade de amostras coletadas por local. O gráfico de pizza apresenta a porcentagem total por filo das macroalgas coletadas.....48
- Figura 2.2.** Porcentagem dos extratos brutos testados, separados entre extratos que não mostraram atividade, extratos que apresentaram atividade superior a 75% em ambas concentrações (50µg/mL e 5 µg/mL) e extratos considerados muito ativos por apresentar atividade superior a 50% na menor concentração de 5 µg/mL.....49
- Figura 2.3.** Inibição do crescimento de células HCT-116 (câncer de cólon), induzido pelos extratos obtidos das macroalgas marinhas nas duas diferentes concentrações testadas (50µg/mL em verde, e 5µg/mL em azul). EACF: Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz; I: Ipanema; IP: Ilha Pinguim; PP: Punta Plaza; YP: Yellow Point.....50
- Figura 2.4.** Cromatograma obtido dos extratos das amostras que apresentaram uma maior atividade citotóxica contra a linhagem de células tumorais HCT-116 (câncer de cólon) por CG-EM.....52
- Figura 2.5.** Estrutura de algumas das substâncias majoritárias sugeridas pelas bibliotecas NIST 05 e WILLEY 7 presentes nas amostras que apresentaram uma maior atividade citotóxica contra a linhagem de células tumorais HCT-116 (câncer de cólon) por CG-EM.....53
- Figura 3.1.** a. Mapa da localização da Península Antártica (em destaque vermelho) e da Ilha Rei George nas Ilhas Shetland do Sul na Península Antártica. b. Locais de coleta das macroalgas: 1. Ilha Pinguim (IP), 2. Yellow Point (YP), 3. Estação Antártica Comandante Ferraz (E), 4. Punta Plaza (PP), 5. Ipanema (I). Fonte: *Adaptado de Google Earth e Wikimedia Commons [Giovanni Fattori]*.....58
- Figura 3.2.** Espécies de macroalgas coletadas: a. *Adenocystis utricularis*, b. *Ascoseira mirabilis*, c. *Curdiea racovitzae*, d. *Desmarestia anceps*, e. *Georgiella confluens*, f. *Gigartina skottsbergii*, g. *Iridaea cordata*, h. *Monostroma hariotii*, i. *Palmaria*

decipiens, j. *Plocamium cartilagineum*, k. *Pyropia endiviifolia*, l. *Spongomorpha arcta*.....63

Figura 3.3. Cromatografia em camada delgada das amostras coletadas na Península Antártica. FM: a. CH₂Cl₂ 100%, b. CH₂Cl₂:AcOEt:1:1. Revelador: 5% H₂SO₄ em EtOH. IP: Ilha Pinguim; EACF: Estação Antártica Comandante Ferraz; PP: Punta Plaza; I: Ipanema; YP: Yellow Point.....66

Figura 3.4. CCD das macroalgas marinhas coletadas na Península Antártica. FM: CH₂Cl₂:AcOEt:4:6. Reveladores: a. UV 365nm, b. 5% H₂SO₄ em EtOH, c. KMnO₄, d. Ninhidrina, e. FeCl₃, f. Dragendorff. IP: Ilha Pinguim; EACF: Estação Antártica Comandante Ferraz; PP: Punta Plaza; I: Ipanema; YP: Yellow Point.....70

Figura 3.5. Gráfico dos escores dos Componentes Principais 1 e 2 (CP1 e CP2) na Análise dos Componentes Principais dos perfis químicos obtidos por CG-EM. Círculos de diferentes cores representam cada espécie de amostra avaliada neste estudo.....72

Figura 3.6. (A) Peso do sinal do cromatograma na variação de CP1 pelo tempo de retenção. (B) Peso do sinal do cromatograma na variação de CP2 pelo tempo de retenção.....73

Figura 3.7. Substâncias sugeridas mais importantes na separação das espécies avaliadas.....73

Figura 3.8. Cromatograma obtido do extrato da macroalga *Iridaea cordata* coletada na Ilha Pinguim, por CG-EM.....74

Figura 3.9. Cromatograma obtido do extrato da macroalga *Desmarestia antarctica* coletada em Ipanema, por CG-EM.....76

Figura 3.10. Cromatograma obtido do extrato da macroalga *Curdiea racovitzae* coletada em Punta Plaza, por CG-EM.....77

Figura 3.11. CCD da amostra *Desmarestia acnceps* (IP) e as seis frações obtidas. FM: a. CH₂Cl₂ 100%, b. CH₂Cl₂:AcOEt (6:4). EB: Extrato bruto. Frações: (1) Hex:AcOEt (9:1), (2) Hex:AcOEt (7.5:2.5), (3) Hex:AcOEt (4:6), (4) AcOEt 100%, (5) AcOEt: MeOH (9:1) e (6) MeOH 100%.....79

Figura 3.12. CCD da amostra *Curdiea racovitzae* (PP) e as seis frações obtidas. FM: a. CH₂Cl₂ 100%, b. CH₂Cl₂:AcOEt (6:4). EB: Extrato bruto. Frações: (1) Hex:AcOEt (9:1),

(2) Hex:AcOEt (7.5:2.5), (3) Hex:AcOEt (4:6), (4) AcOEt 100%, (5) AcOEt: MeOH (9:1) e (6) MeOH 100%.....80

Figura 3.13.Cromatogramas das frações obtidas da amostra *Desmarestia anceps* (IP) EB: Extrato bruto, F1: Hex:AcOEt (9:1), F2: Hex: ACOEt (7.5:2.5), F3: Hex:AcOEt (4:6), F4: AcOEt. Frações ativas contra Mtb H₃₇Rv: F2 (16,9 ± 1,3) e F3 (16,7±1,3).....82

Figura 3.14.Cromatogramas das frações obtidas da amostra *Curdiea racovitzae* (PP) EB: Extrato bruto, F1: Hex:AcOEt (9:1), F2: Hex: ACOEt (7.5:2.5), F3: Hex:AcOEt (4:6), F4: AcOEt. Frações ativas contra Mtb H₃₇Rv a. F2 (6,0 ± 1,2) e F4 (17,8±1,5).....85

ÍNDICE DE TABELAS

Table 1. Collection information and species used in this study.....	26
Table 2. Antimycobacterial, immunomodulatory, and cytotoxic activities of Antarctic seaweed used in this study.....	27
Table 3. Principal constituents suggested by the GC-MS database of promising anti-TB seaweed samples.....	30
Tabela 2.1. Valores de IC ₅₀ , CI95% e r ² dos 14 extratos que mostraram potencial anticâncer nas duas concentrações dos extratos (50µg/mL e 5µg/mL), testados quantitativamente a partir do ensaio do MTT, utilizando as linhagens HCT-116 (câncer de cólon).....	50
Tabela 2.2. Substâncias majoritárias das amostras que apresentaram uma maior atividade citotóxica contra a linhagem de células tumorais HCT-116 (câncer de cólon) por CG-EM.....	52
Tabela 3.1. Reveladores específicos utilizados na identificação de classes químicas em CCD.....	60
Tabela 3.2. Informações sobre os rendimentos dos extratos brutos das macroalgas marinhas coletadas na Península Antártica.....	64
Tabela 3.3. Substâncias majoritárias detectadas no extrato da macroalga <i>Iridaea cordata</i> coletada na Ilha Pinguim, por CG-EM.....	75
Tabela 3.4. Substâncias majoritárias detectadas no extrato da macroalga <i>Desmarestia antarctica</i> coletada em Ipanema, por CG-EM.....	76
Tabela 3.5. Substâncias majoritárias detectadas no extrato da macroalga <i>Curdiea racovitazae</i> coletada em Punta Plaza, por CG-EM.....	77
Tabela 3.6. Atividade antimicobacteriana, imunomodulatória e citotóxica das frações obtidas.....	81
Tabela 3.7. Substâncias majoritárias detectadas nos extratos e frações das macroalgas <i>Desmarestia anceps</i> (IP) sugeridas por CG-EM.....	83

Tabela 3.8. Substâncias majoritárias detectadas nos extratos e frações das macroalgas <i>Curdiea racovitzae</i> (PP) sugeridas por CG-EM.....	86
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-FU	5-fluorouracil
AcOEt	Acetato de etila
ACP	Análise de componentes principais
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosina trifosfato
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CFU	Colony-forming unit
CI	Confidence interval
CG-ES	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxide – Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	EACF
EACF	Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz;
EtOAc	Ethyl Acetate
FBS	Fetal Bovine Serum
FM	Fases móveis
GC-MS	Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry
HCl	Hydrochloric Acid – Acido clorídrico
He	Helium – Helio
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I	Ipanema

IC	Inhibitory Concentration – Concentração Inibitória
IL-1 β	Interleucina 1 beta
LNMA	Acetate of NG-methyl-L-arginine
LPS	Lipopolysaccharide – Lipopolissacarídeo
NCI	National Cancer Institute
NO	Nitric Oxide – Óxido nítrico
MeOH	Metanol – Metanol
MIC	Minimum Inhibitory Concentration – Concentração Mínima Inibitória
MDR-TB	Tuberculosis multirresistente
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MTT	3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide – sal 3-(4,5-dimetilazol-2-tiazolil)-2,5-difenil2H tetrazolina bromida
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNM	Produtos Naturais Marinhos
PNs	Produtos naturais
PI	Penguin Island
PP	Punta Plaza
ProAntar	Programa Antártico Brasileiro
PUFA	Polyunsaturated fatty acids – Ácidos graxos poli-insaturados
PTFE	Politetrafluoroetileno
RNA	Ácido ribonucleico
RR-TB	Tuberculosis resistente à rifampicina
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SFA	Saturated fatty acids

SFB	Soro fetal bovino
SI	Selectivity index
SPs	Polissacarídeos sulfatados
TB	Tuberculose
TNF	Fator de necrose tumoral
UV	Ultravioleta
VHOCs	Volatile halogenated organic compounds
XDR-TB	Tuberculosis extremadamente resistente
YP	Yellow Point

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE QUÍMICA E DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE MACROALGAS MARINHAS DE ECOSISTEMAS ANTÁRTICOS

1. INTRODUÇÃO

1.1. PRODUTOS NATURAIS

Em termos gerais, um produto natural é qualquer produto isolado a partir de uma fonte natural (microrganismos, plantas ou animais) (MARCO VENTURA, 2010). Estas substâncias orgânicas podem se dividir em dois grandes grupos. Metabólitos primários, denominados assim por constituir a base fundamental e comum dos processos vitais, produzindo-se em todas as células e desenvolvendo um papel central no metabolismo e na reprodução celular, como as proteínas, os ácidos nucleicos, os carboidratos e os lipídios. E os metabólitos secundários, geralmente encontrados em pequenas quantidades em alguns organismos e com grande variabilidade estrutural (HANSON, 2003; MARCO VENTURA, 2010).

Os metabólitos secundários, também conhecidos como produtos naturais, apresentam funções específicas de acordo com os organismos que os produzem; muitas vezes também vitais. Atualmente, embora as discussões sobre as supostas funções dos metabólitos secundários ainda persistiam, diversas evidências revelaram que estas substâncias estão intimamente relacionadas a alguma função ecológica ou a própria biologia do organismo produtor. Eles atuam como mediadores químicos nas interações entre o organismo e o ambiente biótico ou abiótico (SOARES; PEREIRA; SOARES, in press).

1.2. PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

A ênfase em Produtos Naturais Marinhos (PNM) iniciou na década de 50 com o trabalho pioneiro de Werner Bergmann e seus colaboradores sobre o isolamento e a caracterização de *espongotimidina* e *espongouridina*, nucleotídeos não ribossomais isolados da esponja *Cryptotethia cripta* e a avaliação de suas propriedades farmacológicas (BLUNT; MUNRO, 2008; SIMÕES et al., 2016b).

Na década de 60, a necessidade de controlar a aparição de cepas resistentes a antibióticos, e o surgimento de novas doenças estimulou a procura por fontes não convencionais de

produtos naturais bioativos (DONIA; HAMANN, 2003; FUSETANI, 2000). Apesar da grande biodiversidade do ambiente terrestre, a maior biodiversidade do planeta está nos oceanos e mares do mundo, com 34 dos 36 filos da vida representados (DONIA; HAMANN, 2003). Se consideramos que mais do 70% da superfície terrestre está coberta por mares e oceanos, e contém mais de 300.000 espécies descritas de plantas e animais, o mundo marinho se apresenta como uma enorme fonte de substâncias biologicamente ativas, com um grande potencial para o descobrimento de novos fármacos (KIM, 2014; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2002).

Apesar do recente interesse por organismos marinhos como fontes de produtos biotecnológicos, quando comparado com estudos com organismos terrestres, o número de substâncias bioativas é elevado, impulsionando diversos estudos, principalmente para o desenvolvimento de medicamentos (KIM, 2014; LI; LOU, 2018; SNELGROVE, 2016). Os organismos marinhos produzem diferentes classes de produtos naturais, com uma grande diversidade e um amplo espectro de atividade biológica, como as atividades antibacteriana (AQIL et al., 2011; MAYER et al., 2011), antifúngica (EL-HOSSARY et al., 2017), anticancerígena (CHEN et al., 2015; HUSSAIN; FAREED; ANSARI, 2012; KUMAR; ADKI, 2018), antiviral (ABDELMOHSEN et al., 2017; UZAIR; MAHMOOD; TABASSUM, 2011), anti-inflamatória (CHEUNG et al., 2016; FERNANDO; NAH; JEON, 2016) entre outras. Acredita-se que isso se deva à exposição desses organismos à ambientes excepcionais, submetidos à diferentes pressões ecológicas, como a competição por espaço e a defesa contra herbívoros e microrganismos patogênicos, levando à produção de metabolitos secundários únicos (BLUNT; MUNRO, 2008; KIM, 2014, p.).

A maioria dos produtos naturais bioativos de origem marinha tem sido isolados a partir de microrganismos (bactérias, cianobactérias, fungos), algas, esponjas, corais, moluscos, briozoários, tunicados, equinodermos e cordados (FAULKNER, 2001; HU et al., 2015). Com isso, a procura de novas substâncias de origem marinha resultou no isolamento de mais de 29.000 metabolitos, sendo muitos deles bioativos. Em sua grande maioria, extraídos de organismos sésseis, sintetizados como produtos de defesa frente a predadores, competição por luz e por nutrientes (KELECOM, 2002; MONTALVÃO, 2016; SIMÕES et al., 2016b).

1.3. MACROALGAS MARINHAS

A palavra alga é usada para designar um grande, variado e heterogêneo grupo de organismos. Alguns cientistas estimam que possa haver entre um e dez milhões de espécies diferentes, a maioria das quais ainda não foi descrita (MOURITSEN; MOURITSEN, 2013). Existem mais de 35.000 espécies conhecidas de algas, desde as microscópicas até as gigantes, que podem atingir os cem metros. Quase sempre são encontradas em meio aquático (com algumas exceções que colonizaram a superfície terrestre). As algas aquáticas podem ser encontradas em água doce ou em ambientes marinhos; este último tipo, é conhecido como macroalgas marinhas (MOURITSEN; MOURITSEN, 2013; SAMBAMURTY, 2017).

As macroalgas marinhas são encontradas em todas as áreas costeiras do mundo, em todos os oceanos da Terra, e em todas as zonas climáticas, desde os mares quentes dos trópicos até as regiões polares geladas do Ártico e da Antártica. Estima-se que existam mais de 10.000 espécies diferentes de macroalgas marinhas (MOURITSEN; MOURITSEN, 2013; O'CONNOR, 2017). Essas algas desempenham um papel fundamental nos ecossistemas marinhos, fornecendo alimento e abrigo para muitos organismos marinhos que vivem nelas. Apesar de pensarmos que o oxigênio que respiramos provém de plantas terrestres, algas marinhas de todos os tamanhos fornecem cerca de 75% do suprimento de oxigênio do planeta por meio da fotossíntese e absorvem uma enorme quantidade de dióxido de carbono atmosférico (O'CONNOR, 2017).

As macroalgas marinhas são classificadas em três grupos principais: algas pardas (Phaeophyceae), algas verdes (Chlorophyta) e algas vermelhas (Rhodophyta). Mesmo que essa classificação seja inequívoca, nem sempre é possível usar cores para classificar uma determinada espécie de alga marinha. Essa característica varia de acordo com o número e tipos de pigmentos que contém, bem como sua estrutura tecidual. Estima-se que 1.800 espécies de macroalgas pardas, 6.200 macroalgas vermelhas e 1.800 macroalgas verdes sejam encontradas no ambiente marinho. Embora as algas vermelhas sejam mais diversas, as pardas são as maiores e de maior biomassa (MOURITSEN; MOURITSEN, 2013; O'CONNOR, 2017).

As macroalgas marinhas estão em constante interação com seu ambiente físico-químico e com outros organismos marinhos. Entre os principais fatores ambientais (abióticos) que afetam fisiologicamente as macroalgas marinhas estão as taxas de nutrientes, o

movimento da água, alta salinidade, temperaturas extremas, mudanças rápidas na intensidade luminosa, radiação UV, concentrações de O₂ e CO₂. Entre as interações biológicas (bióticas) estão as relações entre as macroalgas marinhas e suas bactérias epífitas, fungos, algas e animais sésseis, além das interações com herbívoros e o impacto de predadores. Os padrões individuais de crescimento, morfologia e reprodução são efeitos gerais de todos esses fatores combinados, permitindo que as macroalgas desenvolvam um fenótipo adequado para sobreviver no ambiente ao que estão expostas (HURD et al., 2014).

Os metabólitos primários das macroalgas marinhas, como em qualquer outro organismo vivo, estão diretamente envolvidos em funções fisiológicas basais como o crescimento e a reprodução, enquanto que os metabólitos secundários são principalmente substâncias produzidas sob diferentes condições de estresse, como exposição à radiação ultravioleta (UV), mudanças de temperatura e salinidade ou poluentes ambientais (ROSA et al., 2019). As macroalgas marinhas são conhecidas por produzirem mais de 3600 metabólitos secundários estruturalmente diversos dotados com atividades biológicas relevantes e potenciais aplicações em diversas áreas (RIBEIRO et al., 2012).

1.4. ANTÁRTICA

A história contada pelo registro fóssil diverso da Antártica – que já foi a massa central do supercontinente de Gondwana – revela que nem sempre esse continente foi coberto por gelo, pelo contrário, foi o lar de muitos seres vivos. Suas rochas antigas, ricas em fósseis, revelam evidências de climas anteriores mais quentes. O continente desempenhou um papel fundamental na migração e distribuição de quase toda a vida nos continentes do sul de hoje, mostrando ser a chave para entender a origem da fauna e da flora de todas as principais massas terrestres do hemisfério sul. As implicações desses eventos continuam a ter uma influência direta no clima global e no destino da maioria dos ecossistemas vivos da Terra (SHARMA, 2001; STILWELL; LONG, 2011).

Nenhum outro continente na Terra passou por mudanças ambientais tão radicais como a Antártica. Em sua transição da rica biodiversidade para a árida e fria terra de nevascas que vemos hoje, a Antártica (ou Antártida) fornece um estudo de caso de como as mudanças sutis no posicionamento continental podem afetar as comunidades vivas e como a rapidez das mudanças catastróficas que podem ocorrer (STILWELL; LONG, 2011).

A Antártica é o continente mais frio, mais ventoso, mais seco, mais alto, mais distante e mais misterioso de todos os continentes na Terra. É um continente quase completamente coberto por gelo e cercado pelo oceano ao redor. Sua área cobre perto do 10 % da superfície terrestre, com aproximadamente 14 milhões de quilômetros quadrados, sendo maior que a Europa (10,5 milhões de quilômetros quadrados) e os Estados Unidos de América (9,4 milhões de quilômetros quadrados), mas tem menos da metade do tamanho da África (30,3 milhões de quilômetros quadrados) (SHARMA, 2001; STILWELL; LONG, 2011). Entre todos os continentes, é o mais inacessível, sendo bloqueado pelo oceano do sul, o qual congela ao redor com um denso gelo marinho, cuja área varia de 2,65 milhões de quilômetros quadrados no verão (dezembro a janeiro) a 18,8 milhões de quilômetros quadrados no inverno (julho a setembro) (SHARMA, 2001; STILWELL; LONG, 2011).

A Antártica é o continente mais alto, com uma altitude média acima do nível do mar de 2.300 m. A montanha mais alta do continente é o *Vinson Massif*, que fica a 5.140 m acima do nível do mar. O vento máximo registrado foi de 327 km/h, em 1972. O continente também é o mais seco da Terra, com uma precipitação média de 150 mm por ano. Em termos de riquezas minerais, estima-se que a Antártica seja abundante em petróleo, gás, cobre, urânio, entre outros minerais de grande valor comercial. Isso sem falar que a Antártica possui 70 % da água doce do planeta (SHARMA, 2001).

Antártica é o continente mais frio, onde a temperatura mais baixa do mundo foi registrada (-89,6 °C). Apresenta um período muito curto de verão, de novembro a fevereiro, e um inverno muito longo, de março a outubro. A temperatura no interior permanece sempre muito abaixo do ponto de congelamento, enquanto na região costeira, durante o pico do verão, foram registradas temperatura acima de 0° C (SHARMA, 2001).

O continente antártico é uma das regiões mais sensíveis em relação às variações climáticas de escala global e dos processos atmosféricos, biológicos, criosféricos e oceânicos. A Antártica possui 90% da massa de gelo do planeta e é o principal sorvedouro de energia da Terra, tendo papel essencial na circulação atmosférica e oceânica e, conseqüentemente, no sistema climático terrestre (MCTI, 2013, 2018; POSADA-SWAFFORD, 2016).

As grandes diferenças climáticas e geográficas que existem entre a zona continental Antártica e as zonas com influência marítima se refletem também na sua flora e fauna.

Desta forma, enquanto a zona continental antártica se caracteriza pelo pouco número de espécies vegetais e animais conhecido, os mares e zonas litorais são particularmente ricas em formas biológicas. Devido às rigorosas condições ambientais, a vida na Antártica tem se desenvolvido sob diferentes mecanismos adaptativos que incluem desde hábitos comportamentais, até complexas adaptações fisiológicas (IZAGUIRRE; MATALONI, 2000).

A vegetação terrestre na Antártica está representada principalmente por algas, líquens e musgos. É frequente encontrar algas crescendo no solo, especialmente nas áreas costeiras. Também crescem algas microscópicas sobre a neve, estas se reconhecem com facilidade por sua grande abundância, dando à neve uma coloração vermelha, amarela ou esverdeada. Na Antártica existem mais de 450 espécies registradas de líquens (organismos simbiotes compostos por algas e fungos), estes organismos crescem sobre as rocas dando-lhes colorações amarelas, laranjas, vermelhas e verdes, dependendo da espécie (IZAGUIRRE; MATALONI, 2000).

Estações de escuridão e luz determinam os ciclos de vida na Antártica, onde as variações de temperatura e clima são dramáticas, os imperativos de abrigo, alimentação e reprodução são previstos dentro de uma curta primavera e um verão com luz quase constante, antes de um breve outono e um longo período de inverno escuro e intensamente frio. O verão é a estação de maior atividade animal e o inverno é marcado por frio intenso, tempestades severas e escuridão. (MARTIN, 2013).

A Antártica é conhecida como o entorno mais extremo da Terra. Com condições ambientais, extremas e grandes variações ao longo do ano, como a disponibilidade de substrato, fotoperíodo, variações de temperatura, salinidade, pH e altos níveis de UV limitam o crescimento e caracteriza uma elevada variabilidade temporal e espacial dos organismos no continente (CAMPBELL; URRY; REECE, 2010; PELLIZZARI et al., 2017; SANCHEZ, 2007). Apesar disso, uma alta biodiversidade com altos níveis de espécies endêmicas é descrita. As condições ambientais restritas de clima e habitats fazem com que os organismos adaptados às condições extremas representem uma das maiores fontes para obtenção de substâncias com potencial biotecnológico. No entanto, dos mais de 29.000 PNM isolados, dos quais, aproximadamente 41% foram descobertos nos últimos 10 anos (CARROLL et al., 2019; SIMÕES et al., 2016a), somente 0,7% tem sido isolado de organismos de regiões polares, o Ártico e o continente Antártico (CARROLL

et al., 2019; MONTALVÃO, 2016), representando o pouco que foi até hoje explorado, quando comparado com outras regiões.

1.4.1. MACROALGAS MARINHAS DA ANTÁRTICA

A pesquisa sobre macroalgas na Antártica começou com as expedições de Gaudichaud, Bory, Montagne, Hooker e Harvey em 1817. Os estudos mais importantes durante esse período foram focados principalmente em estudos taxonômicos e biogeográficos, permitindo produzir o primeiro catálogo de macroalgas marinhas bentônicas antárticas e subantárticas em 1964. A introdução do mergulho autônomo abriu uma nova era no estudo de macroalgas marinhas da Antártica; numerosos estudos envolvendo mergulho foram realizados, permitindo pela primeira vez descrições mais precisas da distribuição em profundidade das macroalgas antárticas. Nos anos subsequentes, grandes tentativas foram feitas para investigar a história de vida das espécies antárticas. Nesse período, o conhecimento científico de macroalgas da Antártica foi consideravelmente ampliado e a primeira monografia dessas espécies ecologicamente importantes foi compilada. Estudos recentes se enfocam na análise das defesas contra organismos incrustantes e herbívoros, bem como o efeito das mudanças climáticas globais na distribuição geográfica (WIENCKE; AMSLER; CLAYTON, 2014).

Na Antártica, as macroalgas marinhas crescem ligadas a superfícies rochosas submersas abaixo da zona livre do gelo, que normalmente se estende até 15 m de profundidade. Na Antártica Ocidental, por exemplo, a alga parda da ordem Desmarestiales domina as comunidades de macroalgas, nas quais, espécies menores e mais delicadas formam um sub-bosque. Em altas latitudes da Antártida Oriental as algas vermelhas dominam as comunidades de macroalgas marinhas. O limite inferior de algas marinhas é provavelmente de cerca de 70 m de profundidade. Em algumas localidades, como na Ilha Rei George, as algas marinhas são encontradas em grandes quantidades arribadas nas praias e suportam várias espécies animais, como nematoides e mesoherbívoros (RIFFENBURGH, 2007).

A distribuição espacial das algas nas ilhas Antártica e Subantártica é fortemente limitada e está correlacionada com parâmetros ambientais. A comparação dos registros de 2010–2011 com estudos de 1975 revela uma série de novos registros para essa parte da Península Antártica, tanto a nível de gênero quanto de espécie (MYSTIKOU et al., 2014). Algumas investigações descobriram que mudanças em vários parâmetros (como

cobertura de gelo, dinâmica de sedimentos, irradiância, competição e herbívora) além de mudanças de temperatura, podem afetar a composição e a diversidade das comunidades de macroalgas na região (PELLIZZARI et al., 2017).

As algas são uma fonte importante de matéria orgânica em várias áreas do litoral da Antártica, contribuindo com quantidades significativas de nutrientes para as cadeias alimentares da deste continente. As pesquisas demonstraram que nas águas profundas da baía da Ilha Rei George, a 2000 m de profundidade, as macroalgas contribuem fortemente para o total de carbono orgânico (RIFFENBURGH, 2007). Na Baía do Almirantado, as camadas de algas cobrem cerca do 30% da superfície inferior constituindo, assim, uma estimativa de 74.000 toneladas de biomassa úmida (OLIVEIRA et al., 2009).

As algas antárticas têm uma estratégia de vida oportunista e crescem predominantemente no verão. Podem tolerar períodos escuros de até 1 ano sem sofrer danos, e seus requisitos de luz para fotossíntese e crescimento são muito baixos. Muitas espécies da Antártica só crescem (e se reproduzem) em temperaturas abaixo de 5°C. As demandas de pouca luz explicam a ocorrência de algas marinhas abaixo de cerca de 70 m. As demandas de baixa temperatura determinam sua fronteira de distribuição norte ao redor da convergência antártica (RIFFENBURGH, 2007).

Apenas algumas espécies de algas marinhas têm distribuição equatorial, ocorrendo tanto no Ártico quanto na Antártica, provavelmente evoluindo em um hemisfério e se espalhando pelo equador durante um período de temperaturas mais baixas do mar durante as eras glaciais. (RIFFENBURGH, 2007). A flora antártica de algas marinhas é caracterizada por baixa riqueza de espécies em comparação com as espécies temperadas e tropicais. Adaptações fisiológicas e metabólicas altamente eficientes permitiram com que organismos sesséis como as macroalgas marinhas, sem defesas físicas e expostas à diversas condições ambientais, prosperassem nas condições ambientais do continente antártico (MYSTIKOU et al., 2014; NAVARRO; HUOVINEN; GÓMEZ, 2016; WIENCKE et al., 2007). Aproximadamente, 40% das espécies de macroalgas antárticas são endêmicas desta região, sendo as mais abundantes as Rhodophyta (61%), seguidas das Ochrophyta (29,3%) e as Chlorophyta (9,7%) (VEGA; MERCURI, 2000). Porém, existem níveis mais altos de endemismo nas algas pardas (44%) e vermelhas (32%) do que nas verdes (18%). O número de espécies conhecidas de algas é provavelmente subestimado, estimando-se cerca de 130 espécies de macroalgas marinhas (RIFFENBURGH, 2007; WIENCKE, 2011).

As espécies de algas antárticas são adaptadas a ambientes extremos, mostrando alta sensibilidade a mudanças bruscas de fatores abióticos, tornando-as adequados como bioindicadores para monitoramento ambiental em uma área onde as mudanças climáticas e outros fatores estressores são evidentes. A diversidade de algas marinhas pode ser utilizada em diversos estudos como bioindicador de alterações meteorológicas e oceanográficas, estudos bioquímicos com foco em metais traço e outros contaminantes e nas interações de parâmetros abióticos com comunidades marinhas bentônicas (PELLIZZARI et al., 2017).

Para se protegerem dos raios ultravioletas, as macroalgas marinhas desenvolveram defesas que incluem: o aumento da espessura do talo e a produção de substâncias fotoprotetoras, como os aminoácidos do tipo das micosporinas e os florotaninos, estes últimos que também desempenham funções tanto no metabolismo primário quanto no secundário. Essas estratégias minimizam os danos que a radiação UV induz, por exemplo, no DNA. O conjunto de estratégias metabólicas desenvolvidas pelas macroalgas para fazerem frente ao frio intenso inclui: a manutenção da fluidez das membranas biológicas, mediante o aumento na proporção de ácidos graxos insaturados, com relação aos saturados, nas membranas celulares, evitando que se tornem rígidas; 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 e o desenvolvimento das proteínas de indução de choque frio e anticongelantes (DA SILVA FILHO, 2018).

Diversas atividades têm sido descritas para macroalgas da Antártica como atividade anticancerígena (FRASSINI et al., 2019; KIM et al., 2016; MARTINS et al., 2018; PACHECO et al., 2018; TABOADA et al., 2010), antileishmania (RANGEL et al., 2019), anti-incrustante, algicida (SEVAK, 2010; SEVAK et al., 2012), antiviral (DOS SANTOS SOUZA MARINHO et al., 2017; FURBINO et al., 2014), antioxidante (BERNARDI et al., 2016; CRUCES; HUOVINEN; GÓMEZ, 2013), anti-inflamatória (AVILA, 2016) e antimicrobiana (MARTINS et al., 2018; SACRISTÁN-SORIANO et al., 2017). Metabólitos secundários de macroalgas antárticas, como terpenos, polifenóis, substâncias aromáticas e alcaloides têm sido relatados; (AVILA, 2016; NÚÑEZ-PONS; AVILA, 2015) no entanto, o potencial bioativo desses metabólitos é pouco conhecido sendo a maioria dos estudos realizados apenas com os extratos brutos (AVILA, 2016).

Desta forma, estudos para a descoberta de novas substâncias naturais de organismos da região da Antártica com potencial biotecnológico têm extrema importância geopolítica e econômica, devido a que o Brasil, como membro consultivo, tem o compromisso de realizar pesquisa para continuar sendo parte do Tratado da Antártica (CIRM, 2018; MCTI, 2018). Além disso, entender como este ecossistema influencia nas demais condições e dinâmicas naturais globais é de grande importância para o futuro do planeta (COX, 2008).

1.5. TUBERCULOSE

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa de grande repercussão mundial, concentrando-se principalmente nos países em desenvolvimento; é causada por bacilos do gênero *Mycobacterium*, incluídos no chamado complexo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis* e *M. africanum*) e por outras espécies de micobactérias oportunistas potencialmente patogênicas para o homem (LOZANO, 2002).

Estima-se que um terço da população se encontra infectada por *Mycobacterium tuberculosis*, sendo atualmente a nona principal causa de morte no mundo e a principal causa de morte entre as doenças infecciosas, responsável por mais de 1 milhão de mortes em 2017 (OMS, 2018).

A baixa adesão terapêutica, a infecção por cepas resistentes a medicamentos e a imunodepressão estão significativamente associadas ao aumento da mortalidade por TB. Anualmente, mais de 600.000 pessoas desenvolvem TB resistente à rifampicina (RR-TB), o medicamento de primeira escolha mais eficaz, e mais de 80% desses casos se tornaram casos de tuberculose multirresistente (MDR-TB), ou seja, que tem desenvolvido resistência pelo menos aos fármacos de primeira escolha: isoniazida e rifampicina (MACGOWAN; MACNAUGHTON, 2017; MIGLIORI et al., 2018; OMS, 2018).

Os medicamentos antituberculose essenciais levam em consideração três propriedades fundamentais: capacidade bactericida, capacidade de esterilização e capacidade de prevenir resistência. Estes possuem essas propriedades em diferentes graus (MAHER et al., 1997), e podem ser classificados em três grupos (LOZANO, 2002; MAHER et al., 1997):

Medicamentos de primeira escolha: estes medicamentos têm um grau máximo de eficácia combinado com uma toxicidade aceitável. Eles podem tratar com sucesso a grande maioria dos pacientes e são incluídos em todos os regimes iniciais de tratamento da

tuberculose. Estão incluídos neste grupo rifampicina, pirazinamida, isoniazida, etambutol e estreptomicina. Isoniazida e rifampicina são os medicamentos bactericidas mais potentes, ativos contra todas as populações de bacilos tuberculosos. A pirazinamida e a estreptomicina também têm propriedades bactericidas contra certas populações de bacilos da tuberculose, e é ativa em meio ácido contra os bacilos encontrados nos macrófagos. A estreptomicina é ativa contra os bacilos tuberculosos na fase de multiplicação extracelular rápida. Já o etambutol, o qual é bacteriostático, é associado a medicamentos bactericidas mais potentes para prevenir o surgimento de bacilos resistentes.

Medicamentos de segunda linha: São medicamentos que, em princípio, têm eficácia mais limitada e seu equilíbrio benefício / risco é menos satisfatório do que os da primeira escolha. Em qualquer caso, com alguma frequência, é necessário recorrer a eles devido ao aparecimento de resistência ou devido a fatores específicos para o paciente. Eles incluem etionamida, ácido paraminosalicílico, cicloserina, amicacina, capreomicina e rifabutina.

Novos medicamentos utilizáveis no tratamento da tuberculose: São medicamentos que, embora em princípio possam ter sido utilizados no tratamento de outras doenças infecciosas, o aparecimento de cepas multirresistentes obrigou seu uso a ser avaliado no tratamento da tuberculose. Drogas como ciprofloxacina, levofloxacina, ofloxacina, moxifloxacina, clofazimina, amoxicilina/clavulanato, macrolídeos etc. podem ser incluídas nesta categoria.

O *Mycobacterium tuberculosis* dá origem a populações heterogêneas e mutantes; portanto, o tratamento deve ser feito com terapia combinada, para evitar a seleção de mutantes resistentes, e a duração do tratamento deve ser longa o suficiente para eliminar todas as populações bacilares (LOZANO, 2002). O tratamento exige no mínimo 6 meses da combinação de antibióticos de primeira escolha, um tratamento excepcionalmente longo, quando comparado com outras doenças infecciosas bacterianas, podendo provocar graves efeitos colaterais (efeitos hepatotóxicos, distúrbios gastrointestinais, reações alérgicas e artralgias) (BONACHERA; ROSIQUE, 2007; HORSBURGH; BARRY; LANGE, 2015).

Se o tratamento da tuberculose não for feito corretamente, os bacilos podem se tornar resistentes aos medicamentos utilizados. A transmissão com bacilos resistentes a medicamentos produz tuberculose resistente que só é diagnosticada quando, após 3-5 meses de tratamento, é ineficaz. Então é necessário recomeçar desta vez usando drogas que são muito menos eficazes, mais tóxicas e cujo manejo requer muita experiência do médico. Isso frequentemente leva o paciente a morrer ou apresentar tuberculose crônica com capacidade de contágio pelo resto da vida (LOZANO, 2002).

Na atualidade, um dos maiores problemas que o mundo enfrenta é a rápida propagação de agentes patogênicos ao homem e a resistência bacteriana que eles apresentam (MUDIMU et al., 2014). Esta problemática se deve geralmente à diminuição da eficiência dos antibióticos disponíveis e a um mau uso destes (SANTOS et al., 2015). Infelizmente, o diagnóstico tardio, o tratamento inadequado e a falta de adesão a este, contribuem para o desenvolvimento de TB multirresistente (MDR-TB) (NGUTA et al., 2015; QUAN et al., 2017). A urgência na procura de novas classes de antibióticos para combater a propagação de microrganismos multirresistentes é cada vez mais evidente (DONIA; HAMANN, 2003; FUSETANI, 2000; KIM, 2014).

As primeiras cepas resistentes aos antibióticos de primeira linha de tratamento apareceram no final dos anos 90. Desde então, a busca de pequenas moléculas com novos mecanismos de ação tem crescido. Nesse contexto, dois fármacos foram aprovados, em 2012, para o tratamento da MDR-TB e tuberculose extremamente resistente (XDR-TB), a bedaquilina, que inibe a ATP sintase, e a delamanida, que inibe a biossíntese do ácido micólico (BLOEMBERG et al., 2015).

Atualmente, os produtos naturais ou seus derivados semi-sintéticos, desempenham papéis importantes na quimioterapia da tuberculose. Antibióticos de aminoglicosídeo, como a estreptomicina, isolada de *Streptomyces griseus*, péptidos cíclicos, como a capreomicina, isolada de *S. capreolus* e viomicina, análogos semi-sintéticos da rifamicina (rifampicina, rifabutina e rifapentina), são usadas em combinação com outras drogas anti-TB como medicamentos de primeira ou de segunda linha (COPP, 2003).

Muitos grupos realizam triagem de extratos de produtos naturais como a etapa preliminar para encontrar novas substâncias ativas. Uma ampla variedade de cepas micobactérias

e ensaios biológicos são utilizados na descoberta de drogas antimicobacteriana (COPP, 2003). Diversos estudos demonstram o potencial anti-TB de diversas substâncias de origem natural de diferentes classes químicas, entre elas alcanos, alcenos, alcinos, aromáticos simples, fenóis, quinonas acetogênicas, peptídeos, alcaloides, terpenos e esteroides com atividade inibidora de crescimento em relação às micobactérias (COPP, 2003; COPP; PEARCE, 2007; OKUNADE; ELVIN-LEWIS,; LEWIS, 2004).

A exploração de substâncias derivadas de organismos marinhos pode ampliar significativamente o conhecimento científico de estruturas potenciais para a descoberta de medicamentos antibióticos. Diversas revisões abrangem dados publicados sobre produtos naturais antituberculose de origem marinhos agrupados de acordo com sua origem biogênica e a sua classe química (DALETOS et al., 2016; HOU et al., 2019; NORA DE SOUZA, 2006).

1.6. CÂNCER

O câncer é um processo no qual as células se multiplicam de maneira incontrolável e autônoma, e disseminam-se em outros tecidos no local, podendo aparecer em quase qualquer parte do corpo. O tumor geralmente invade o tecido circundante e pode metastizar em pontos distantes do corpo. Quase uma em cada seis mortes em todo o mundo é devido a esta doença, sendo a segunda principal causa de morte no mundo; causando cerca de 8,8 milhões de mortes por ano. Cerca de 70% das mortes provocadas por esta doença ocorrem em países de baixa e média renda (OMS, 2020).

Nos últimos anos, o aumento da resistência aos medicamentos antiproliferativos utilizados tornou-se um problema de grande interesse para a saúde pública. Atualmente, não existe terapia 100% eficaz contra o câncer disseminado e, embora as terapias possam ser altamente específicas, a resistência é intrínseca ao câncer e, à medida que as terapias se tornam mais eficazes, a resistência adquirida aumenta. Como resultado desses estudos, novos produtos naturais parecem controlar os dois estágios mais importantes da invasão tumoral: angiogênese e metástase, processos nos quais as enzimas proteases estão envolvidas (FERNÁNDEZ; HERNÁNDEZ; REGUEIRA, 2015).

Os medicamentos antitumorais marinhos incluem substâncias derivadas de tunicados em fase de pesquisa clínica, como agentes quimioterapêuticos contra diferentes tipos de

câncer. A primeira delas é a Didemna B utilizada no câncer de melanoma e próstata, extraída do tunicado *Aplidium albicans*. Yondelis, um dos alcaloides com a mais poderosa atividade antitumoral, isolado do tunicado *Ecteinascidia turbinata*, descrito pela primeira vez em 1969, eficaz em baixas doses no tratamento do câncer de pulmão e contra o tumor ovariano (VALDÉS-IGLESIAS; PÉREZ-GIL; COLOM, 2010).

Existem mecanismos observados nas algas marinhas que permitiram inferir que são fontes potenciais de moléculas com atividade antibacteriana e antiproliferativa. Esta última é a capacidade de algumas substâncias inibirem o desenvolvimento descontrolado de células eucarióticas (FERNÁNDEZ; HERNÁNDEZ; REGUEIRA, 2015). Um dos primeiros artigos que aparecem na literatura sobre a atividade antineoplásica de extratos de algas marinhas é o referente à avaliação de 107 extratos de macroalgas e microalgas marinhas de Ilhas do Oceano Pacífico contra leucemia linfocítica P-388 e tumor ascítico de Ehrlich (KASHIWAGI et al., 1980).

Bactérias isoladas da superfície das algas marinhas também são uma fonte de extratos orgânicos antiproliferativos. Villareal et al. (2010) avaliaram tanto extratos das algas *Sargassum muticum*, *Endarachne binghamiae* e *Centroceras clavulatum* coletadas no México, quanto extratos de bactérias associadas à sua superfície, mostrando atividade inibitória de mais de 50% em células de carcinoma colorretal HCT-116 em concentrações inferiores a 10 µg/mL de extrato.

Entre as substâncias identificadas a partir de macroalgas marinhas, os pigmentos naturais receberam atenção especial. Estas substâncias exibem diversas atividades biológicas benéficas, como atividade antioxidante, anticâncer, anti-inflamatória, antiobesidade e neuro-protetora. Entre estas substâncias, destaca-se a fucoxantina, presente em diferentes espécies de algas pardas e com efeito antioxidante, anticâncer, anti-inflamatório, fotoprotetor e osteoporose preventiva; e a sifonaxantina, também com atividade anticancerígena (PANGESTUTI; KIM, 2011).

Stagos et al. (2012) fizeram uma revisão de diversos polifenóis isolados de plantas contra câncer de fígado ou carcinoma hepatocelular; estas substâncias bioativas apresentam uma alta capacidade antioxidante e atividade biológica específica que afeta a expressão gênica. Este tipo de substâncias são também encontradas em concentrações elevadas em algas pardas; além das fortes propriedades antioxidantes, têm inúmeras atividades biológicas,

como anti-inflamatória, antialérgico, antibacteriano, inibição de antiplasmina, inibição de metaloproteinase da matriz e anticâncer (WIJESINGHE; JEON, 2012).

Polissacarídeos derivados de algas marinhas são uns dos grupos de metabólitos mais amplamente estudado, juntamente com os polifenóis. Vários polissacarídeos sulfatados isolados de macroalgas têm propriedades citotóxicas. Sabe-se que os fucoidanos têm propriedades antitumorais, anticâncer, antimetastáticas e fibrinolíticas em camundongos, e reduzem a proliferação celular (WIJESINGHE; JEON, 2012).

Os terpenos são excepcionalmente amplos em suas atividades citotóxicas e antitumorais. Alguns exemplos incluem derivados de (S) -12-hidroxi-geranilgeraniol e (S) -13-hidroxi-geranilgeraniol de *Bifurcaria bifurcata*; caulerpenina de *Caulerpa taxifolia* a qual possui efeito citotóxico para várias linhas celulares humanas e, como tal, possui propriedades anticâncer, antitumorais e antiproliferativas; o hidroquinona diterpeno, mediterraneol, de *Cystoseira mediterranea*, que é um inibidor da divisão celular mitótica; e os meroterpenos, usneoidona E e Z, de *Cystophora usneoides* que possuem propriedades antitumorais (FERNÁNDEZ; HERNÁNDEZ; REGUEIRA, 2015).

Muitos destes estudos identificaram um potencial excelente das macroalgas como fontes de medicamentos anticâncer; utilizando diversos modelos *in vitro* e *in vivo*. Este tipo de abordagem é útil na triagem inicial de bioatividade, e qualquer atividade encontrada é frequentemente atribuída ao componente predominante dos extratos, porém pode haver outros compostos menos abundantes, mas mais potentes, nos extratos. Quando efeitos potentes são encontrados, é necessário um trabalho adicional para purificar e caracterizar completamente os extratos, para que a atividade possa ser atribuída a uma classe específica de substância e ao mecanismo de ação identificado (MURPHY et al., 2014).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

Avaliar a diversidade química e o potencial biotecnológico de macroalgas marinhas coletadas nas Ilhas Shetland do Sul na Península Antártica.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Criar uma coleção de extratos de espécimes de macroalgas marinhas coletadas nas Ilhas Shetland do Sul, Península Antártica.
- ✓ Avaliar o potencial antimicobacteriano dos extratos das macroalgas marinhas coletadas nas Ilhas Shetland do Sul.
- ✓ Avaliar o efeito imunomodulador dos extratos das macroalgas marinhas coletadas nas Ilhas Shetland do Sul.
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos extratos obtidos das macroalgas marinhas coletadas nas Ilhas Shetland do Sul em linhagem de célula tumoral.
- ✓ Determinar e comparar o perfil químico dos extratos de macroalgas marinhas coletadas nos diferentes locais das Ilhas Shetland do Sul através de técnicas cromatográficas.
- ✓ Identificar as substâncias majoritárias dos extratos obtidos das macroalgas mediante Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CGMS).
- ✓ Isolar e identificar as substâncias bioativas a partir dos extratos das macroalgas marinhas que apresentem uma maior atividade antimicobacteriana.

ATIVIDADE ANTIMICOBACTERIANA E EFEITOS IMUNOMODULATÓRIOS BASEADOS NA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO DE MACROALGAS MARINHAS ANTÁRTICAS

Com a finalidade de alcançar os objetivos específicos 1, 2 e 3, avaliamos a atividade antimicobacteriana e os efeitos imunomodulatórios das macroalgas coletadas nas Ilhas Shetland do Sul, na Península Antártica. Os dados gerados foram escritos no formato de artigo para ser submetido na revista *Journal of Applied Phycology* com o título: "*Antimycobacterial Activity and Nitric Oxide Production Inhibition of Antarctic Seaweeds*", do qual sou primeira autora.

Neste artigo foi avaliada a atividade antimicobacteriana, os efeitos imunomodulatórios e a citotoxicidade de 29 extratos lipofílicos de macroalgas marinhas coletadas em cinco diferentes locais das Ilhas Shetland do Sul, na Península Antártica. Para isso, primeiramente foi criada uma coleção de extratos das macroalgas marinhas coletadas. Os extratos foram preparados utilizando a técnica de extração mediante solvente, utilizando uma mistura de MeOH:AcOEt (1:1).

Para a avaliação da atividade antimicobacteriana foram utilizadas duas cepas de diferente nível de virulência; uma cepa laboratorial padrão, a Mtb H₃₇Rv e uma cepa hipervirulenta, a Mtb M299, as quais, com a finalidade de calcular a Concentração Mínima Inibitória, foram tratadas com as amostras em diferentes concentrações.

Para ter certeza de que as amostras não sejam tóxicas frente a células normais, a citotoxicidade dos extratos em diferentes concentrações foi avaliada frente a macrófagos murinhos RAW 264.7 estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). Os macrófagos foram escolhidos por serem as células hospedeiras da micobactéria.

Na procura de amostras que além de apresentar uma atividade antimicobacteriana, apresentem um efeito imunomodulador, foi realizada a quantificação de NO, utilizando o método de Griess (GRIESS, 1864). O óxido nítrico (NO) atua no sistema imune inibindo a replicação de células tumorais, virais e outros patógenos. Durante a resposta imunológica da tuberculose, o mediador inflamatório NO desempenha um papel importante permitindo aos macrófagos a capacidade de eliminar os bacilos fagocitados

(BENAVIDES; PINZÓN, 2018). A produção de NO em condições patológicas de estresse oxidativo pode modular e amplificar a resposta inflamatória, efeito ocasionado em parte pela interação do NO com o ânion superóxido (O_2^-), que leva à produção de peroxinitrito ($ONOO^-$), uma molécula altamente citotóxica e capaz de ocasionar dano tissular (CHINCHILLA et al., 2008). Portanto, apesar de que a elevada produção de NO pelos macrófagos ativados é um mecanismo antimicrobiano potente (ARAUJO et al., 2008), em alguns casos, pode-se produzir uma inflação exacerbada, junto a outros mediadores pró-inflamatórios, produzindo quadros de hiper inflamação, levando a uma tuberculose pulmonar severa, na qual são ocasionados danos permanentes ao pulmão e a incapacidade funcional a longo prazo (MACGOWAN; MACNAUGHTON, 2017).

Nossos dados demonstraram que dos 29 extratos lipofílicos analisados, 62,1% apresentaram atividade contra a cepa laboratorial padrão Mtb H₃₇Rv e o 31% apresentaram atividade contra a cepa hipervirulenta Mtb M299. Seis amostras foram selecionadas como promissoras por apresentarem atividade dupla (antimicobacteriana e inibidora da produção de NO) e índice de seletividade maior que 10. A análise do perfil químico mostrou substâncias pertencentes a diferentes classes de produtos naturais, principalmente ácidos graxos, esteróis e terpenos nas amostras ativas.

Variações intraespecíficas foram observadas nos diferentes locais de coleta tanto para o perfil químico como para a atividade antimicobacteriana revelando a importância de um estudo entre populações na busca de substâncias bioativas. Neste estudo se evidencia o potencial das macroalgas marinhas da Antártica para produzir substâncias com atividade antimicobacteriana tornando-as ótimas candidatas para o isolamento e identificação de substâncias químicas bioativas.

A metodologia empregada foi realizada em parte no Laboratório de Produtos Naturais - IMCT, UFRJ-Campus Macaé, sob orientação do Professora Michelle Frazão Muzitano e no Laboratório de Biologia do Reconhecer, no Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, em colaboração com a Dra. Elena Lasunskaja e desenvolvida sob orientação da Pós-doutoranda Thatiana Lopes Biá Ventura Simão. A parte química descrita neste artigo foi desenvolvida no Laboratório Integrado de Química, NUPEM, UFRJ - campus Macaé, sob orientação do Dra. Professora Angélica Ribeiro Soares.

Antimycobacterial Activity and Nitric Oxide Production Inhibition of Antarctic Seaweeds

Carolina Rosas Fernández^{1,2}; Thatiana L. B. Ventura³; Elena B. Lassounskaia³; Heitor Monteiro Duarte¹; Pio Colepicolo Neto⁴; Michelle F. Muzitano^{3,5}; Angélica R. Soares^{1,2}

¹*Grupo de Produtos Naturais de Organismos Aquáticos (GPNOA) - NUPEM, UFRJ-Campus Macaé, RJ;* ²*Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, UFRJ - Campus Macaé, RJ.* ³*Laboratório de Biologia do Reconhecer, Centro de Biociências e Biotecnologia, UENF-Campos dos Goytacazes, RJ;* ⁵*Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, SP;* ⁴*Laboratório de Produtos Naturais - IMCT, UFRJ-Campus Macaé, RJ*

Abstract

Antarctica seaweeds produce secondary metabolites with potential for treating several diseases caused by microorganisms. Extreme environmental conditions of Antarctica make organisms that have been able to adapt, an important source for the discovery of bioactive substances. The emergence of increasingly resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* makes the search for both new antimycobacterial agents and adjuvant agents that help control this pathology essential. The objective of this study was to investigate the potential of tuberculosis treatment, evaluating antimycobacterial and immunomodulatory activity (based on NO inhibition) of twenty-nine crude extracts seaweed collected in the Antarctic Peninsula. The antimycobacterial activity was evaluated against the Mtb H₃₇Rv and Mtb M299 and compared with the anti-TB drug rifampicin. LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages were treated with the same samples to assess cytotoxicity and inhibition of NO production. Of the seaweed analyzed, 62.1% of the extracts presented MIC₅₀ below 20 µg/mL against Mtb H₃₇Rv and 31% against Mtb M299. Six samples with dual activity and selectivity index greater than 10 were selected as promising, all with an MIC₅₀ <10 µg/mL against Mtb H₃₇Rv. *Pyropia endiviifolia* was the most active extract in mycobacterial growth-inhibiting against Mtb H₃₇Rv (IC₉₀ 15.3 ± 1.3 µg/mL) and Mtb M299 (IC₉₀ 50.6 ± 1.3 µg/mL) and NO production (IC₅₀ 6.8 ± 1.3 µg/mL). The chemical profiles analysis showed substances belonging to different classes of natural products such as fatty acids, sterols and terpenes in the active samples.

Keywords

Antarctic Seaweed, Antimycobacterial, Immunomodulatory, Marine Natural Products

Introduction

Antarctica is known as the most extreme environment on Earth. This conditions and great variations throughout the year, such as seasonal variations in the light regime, the availability of substrate, due to extended periods of ice cover and snow, low temperatures, salinity variations, and high levels of UV radiance (CAMPBELL; URRY; REECE, 2010; PELLIZZARI et al., 2017; SANCHEZ, 2007). Unlike what is known to terrestrial biodiversity, high levels of endemic species are described to the Antarctic marine life, being characterized by a high temporal and spatial variability of organisms (SCHORIES; KOHLBERG, 2016).

A high degree of endemism has been shown for the Antarctica seaweeds, where approximately 40% of all species are endemic to this region (VEGA; MERCURI, 2000; WIENCKE et al., 2007). High biomass of Antarctica's seaweed indicates the ecological importance of these organisms as primary producers, food source, and refuge for many marine organisms. Highly efficient physiological and metabolic adaptations have allowed organisms, such as seaweed, to prosper in the environmental conditions of the Antarctic continent (MYSTIKOU et al., 2014; NAVARRO; HUOVINEN; GÓMEZ, 2016; WIENCKE et al., 2007). Seaweeds are known as important bioactive secondary metabolite producers. These metabolites play an important role as chemical defenses against fouling (AMSLER et al., 2005; DAHMS; DOBRETSOV, 2017; SEVAK et al., 2012) and herbivores organisms (PEREIRA et al., 2003; TOTH; PAVIA, 2007), as well as chemical cues mediating the selection and location of prey (BORNANCIN et al., 2017; HAY, 2009; NOCCHI et al., 2017), settlement and larval recruitment (TEBBEN et al., 2015), foraging behavior (ZIMMER; COMMINS; BROWNE, 1999), among others. As a part of the physiological response to the environment, the restricted environmental conditions of climate and habitats makes these adapted organisms as one of the greatest sources for obtaining compounds with biotechnological potential. Anticancer (FRASSINI et al., 2019; KIM et al., 2016; MARTINS et al., 2018; PACHECO et al., 2018; TABOADA et al., 2010), antileishmanial (RANGEL et al., 2019), antifouling, algicidal (SEVAK, 2010; SEVAK et al., 2012) antiviral (DOS SANTOS SOUZA MARINHO et al., 2017; FURBINO et al., 2014), antioxidant (BERNARDI et al., 2016; CRUCES;

HUOVINEN; GÓMEZ, 2013), anti-inflammatory (AVILA, 2016) and antimicrobial (MARTINS et al., 2018; SACRISTÁN-SORIANO et al., 2017) activities have been described for the Antarctica seaweeds compounds.

Tuberculosis (TB) is an infectious and contagious disease of great global impact, which focuses mainly on low and middle-income countries that have fragile healthcare infrastructures and constrained resources available, becoming increasingly serious due to the widespread occurrence of drug-resistant strains of the causative pathogen. It is estimated that one third of the world's population would be infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), while more than 10 million new cases of clinical TB and 1 million deaths are reported annually (OMS, 2018). Although efforts to develop new anti-tuberculosis drugs have intensified recently, which resulted in the first approvals of two new anti-tuberculosis drugs in over 40 years (bedaquiline and delamanide) (DONG; PFEIFFER; ALTMANN, 2017; TIBERI et al., 2018), there is still an urgent need for discovery of new antituberculosis drugs in addition to the strategies for the control and eradication of the disease. Since the discovery of streptomycin, the first effective drug against tuberculosis isolated from a microorganism, different natural products with antimycobacterial activity have been described, including rifamycin B, cycloserine and capreomycin (DONG; PFEIFFER; ALTMANN, 2017). One of the first studies evaluating the antimycobacterial activity of seaweeds was Kamimoto (1956), who evaluated several Japanese seaweeds against different strains of *Mycobacterium*, including *M. tuberculosis*. Val et al. (2001), evaluated 44 extracts of seaweed collected in the Canary Islands for their ability to produce substances against *Mycobacterium*, of which only extracts of *Asparagopsis taxiformis* and *Osmundea hybrida* showed activity. Methanol crude extracts of eleven Turkish seaweed were evaluated against *M. tuberculosis*. The extracts of *Cystoseira barbata*, *Ceramium rubrum*, *Gracilaria 21wed21te21e* being active (SÜZGEÇ-SELÇUK et al., 2011). In another study where the authors evaluated 21 brown seaweed from British and Irish waters, only the extract of *Bifurcaria bifurcata*, showed any antituberculosis potential with an IC₅₀ value of 64.0 µg/mL (SPAVIERI et al., 2010). Saravanakumar et al. (2008) investigated the antimycobacterial activity of the red alga *Polysiphonia virgata* and the isolated fraction containing a mixture of long-chain fatty acids, which showed a great inhibition in the growth of *M. smegmatis* and *M. tuberculosis*. Mathayan et al. (2018) evaluated the

antimycobacterial activity of *Sargassum swartzii* extracts obtained from different polarity solvents against *M. tuberculosis* H₃₇Rv cells, some of them showed little activity. Despite of the fact that knowledge about the chemical compounds from Antarctica seaweeds and its pharmacological activities have been growing over the last years, researches pointed out that the potential of these organisms for bioprospection is still scarce. Here, we aimed to investigate the antimycobacterial and immunomodulatory activities of lipophilic extracts of seaweeds, collected at different regions of the Antarctic Peninsula. The cytotoxicity of these extracts from macrophage cultures, which are the host cells of *Mycobacterium*, was also evaluated. In addition, the chemical profile of the extracts was analyzed by chromatographic and spectrometric techniques.

Materials and Methods

Study Sites and Organisms

Twenty-nine samples of seaweed were collected during the XXXVI expedition integrating the Brazilian Antarctic Program, during the austral summer 2017 (November – December) in Admiralty Bay, at different sites on King George and Penguin Islands, South Shetlands, Antarctica (Table 1). Seaweed were randomly collected by hand from the intertidal region, parallel to the cost, during low tide. In the Antarctica laboratories, at the EACF and in the Almirante Maximiniano polar ship, specimens were gently washed in seawater to eliminate macroscopic epibiota associated and sand particles. The material was sorted, identified to species level according to macro- and micromorphological analyses, packed in plastic bags, stored in a freezer at -20 °C and transported to Brazil. Voucher specimens were deposited in the herbarium of the Instituto de Botânica in São Paulo, Brazil and Rio de Janeiro Federal University.

Seaweed Extracts Preparation

In the Brazilian laboratory, frozen samples were lyophilized and homogenized with a grinder before extraction using a mixture of EtOAc: MeOH (1:1) and an ultrasound apparatus (for 20 min). After 72 hours interval the material was filtered, and the algal material was extracted again. This procedure was repeated 3 times, all solvents were combined and evaporated under reduced pressure to yield lipophilic residues.

Chemical Analysis

Gas Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (GC-MS)

Samples were solubilized using dichloromethane (HPLC grade) filtered with PTFE filters and resuspended with EtOAc (HPLC grade). The extracts were analyzed by GC-MS (Shimadzu CG-2010 equipment coupled to the QP-2010 ultra-mass spectrometer, consisting of AOC-20i autoinjector and a RTX-1MS fused silica capillary column (L = 30m x dint = 0.25 nm) from Restek Corporation (USA). A sample (1 μ L) was injected at temperature of 280°C and a split of 5. Helium (He) was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min with the following temperature ramp: initial temperature of 120°C maintained for 2 min, with a of 6°C per min ramp up to 305°C, which was maintained for 3 min for a for a total of 36 minutes of analysis. The ionization source was maintained to 200°C and the interface was maintained to 305°C. Peak identification of crude algal extracts was performed based on comparing the obtained mass spectra with those available in NIST 05 and Wiley 7 libraries.

Antimycobacterial activity

Growth of microorganism

Antimicobacterial activity of seaweed extracts was determined against two strains of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) that differed in virulence level: a low virulence strain (H₃₇Rv) and the highly virulent strain (Mtb M299; isolated from a patient with TB in Mozambique). The strains were grown in Middlebrook 7H9 broth containing 10% albumin dextrose catalase complex (ADC - Difco Laboratories) and 0.05% Tween-80 in the presence of 5% CO₂ at 37°C for 7 days until the log phase under Biosecurity level 3 containment conditions.

Minimal Inhibitory Concentration

Minimum inhibitory concentrations (MIC) of samples were evaluated using a 3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay (MOSMANN, 1983). This method evaluates the functionality of viable Mycobacterias using the tetrazole salt, which once metabolized by dehydrogenase enzyme is converted to a formazan crystal.

Bacterial suspensions (1×10^6 CFU) was then added to each well containing samples at concentrations of 100, 20, 4 and 0.8 $\mu\text{g/mL}$ and to each of the growth-control wells. The sealed plate was incubated at 37°C , 5% CO_2 for 5 days for both strains (GOMEZ-FLORES et al., 1995). The MTT solution (5 mg/mL) was added to each well and the plates were incubated for 3h. After this period, were treated with lysis buffer (20% w/v sodium dodecyl sulfate-SDS / 50% dimethylformamide-DMF in distilled water, pH 4.7). The reading was done using a plate spectrophotometer (Dynatech MR5000) at 570 nm. As a positive control, a bacterial suspension was treated with rifampicin at concentrations of 0.032 to 10 $\mu\text{g/mL}$. As a negative control, a bacterial suspension without treatment was used.

Cytotoxicity test in macrophages

Cell culture

Murine RAW 264.7 macrophage cell line (American Type Culture Collection), was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM-F12 – Gibco) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and gentamicin (1 $\mu\text{g/mL}$) in the presence of 5% CO_2 at 37°C .

For the experiments, the cells were plated in 96-well plates (5×10^4 cells / well) and incubated for 24h in the presence of 5% CO_2 at 37°C , for macrophage adhesion and stability of the culture. For macrophage stimulation, cell cultures were treated with lipopolysaccharide - LPS (1 $\mu\text{g} / \text{mL}$) (Escherichia coli 055: B5; Sigma Aldrich, USA) and incubated for more 24 hours with seaweed samples at concentrations of 100, 20, 4 and 0.8 $\mu\text{g} / \text{mL}$. Part of supernatant was collected to assess the capacity of inhibition of the of inflammatory mediator Nitric Oxide (NO).

MTT assay

The cytotoxic effects of seaweeds on cell viability in RAW 264.7 cultures stimulated with LPS were determined using the MTT assay as previously described. After incubation, the supernatant was discarded, and the formazan crystals were solubilized in isopropanol added with Hydrochloric Acid (HCl) (4mM). The reading was done at 570 nm plate spectrophotometer (Dinatech MR500). Macrophages stimulated with LPS was used as a negative control of cell death and macrophages stimulated with LPS and treated with Triton X100 1% were used as a positive control. The effect of dimethylsulfoxide (DMSO

- Sigma Aldrich), solvent used in the suspension of the samples, was also evaluated to ensure non-interference of the solvent in terms of cellular cytotoxicity.

Cell death was expressed as percent inhibition, which was calculated using the following formula: percent inhibition = $100 - (100 \times (\text{Sample} - \text{Negative Control}) / (\text{positive control} - \text{negative control}))$. IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression analysis of concentration / inhibition curves using GraphPad Prism 6, applying a sigmoidal dose-response variable slope curve. Results was expressed as means with the corresponding 95% confidence interval (CI) of 3 independent experiments in triplicate.

Inhibition of Nitric Oxide Production

The quantification of the inhibition of the production of the inflammatory mediator NO, was evaluated indirectly by measuring the concentration of nitrites in the supernatant. The supernatant previously collected, was transferred to a new 96-well plate, to which Griess reagent (1% p-aminobenzenesulfonamide + 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochlorite in 5% phosphoric acid, Sigma Aldrich) was added (GRIESS, 1939). After 10 minutes, the absorbance was measured in plate spectrophotometer at 540 nm. As a reference for the production of NO, a standard curve was made with sodium nitrite diluted in concentrations of 0.78 to 100uM. The standard drug LNMMA, Acetate of NG-methyl-L-arginine (Sigma Aldrich), was used as a positive control.

Results and discussion

Seaweeds are important secondary metabolite producers (KIM; CHOJNACKA, 2015; PAL; KAMTHANIA; KUMAR, 2014; PEREIRA; NETO, 2014). These compounds display different biological activities, such as antitumoral (BARCELLOS MARINI et al., 2018), antimicrobial (ARUNKUMAR; SIVAKUMAR; RENGASAMY, 2010; SMIT, 2004), antidengue (SALVADOR-NETO et al., 2016), antimycobacterial (BIÁ VENTURA et al., 2015), antileishmanial (MACHADO et al., 2014; SOARES et al., 2016), antifouling (DA GAMA et al., 2008; PARADAS et al., 2016), antioxidante (MARTINS et al., 2013). Despite the impressive seaweed biomass and biodiversity in Antarctica continent, there are few studies about the pharmacological potential for their secondary metabolites. Some examples including antitumoral studies of extracts from Antarctica Peninsula against colorectal cancer cell line-HCT 116 (FRASSINI et al., 2019), fatty acids against human breast cancer adenocarcinoma MCF-7 and MDA-MB-

231 (PACHECO et al., 2018), and antimicrobial activity against a panel of human pathogen fungal and bacterial (MARTINS et al., 2018). In our study, the effect of 29 extracts from 14 Antarctic seaweed species (Table 1) belonging to the genera Chlorophyta (6.9%), Ochrophyta (27.6%) and Rhodophyta (65.5%) collected at different locations in the Antarctica Peninsula were evaluated *in vitro* for their antimycobacterial and for their NO inhibitory potential.

Table 1. Collection information and species used in this study

Phyllum	Species	Collection site
Chlorophyta		
Monostromataceae	<i>Monostroma hariotii</i> Gain	Penguin Island
Ulotrichaceae	<i>Spongomorpha arcta</i> (Dillwyn) Kützing	Penguin Island
Ochrophyta		
Adenocystaceae	<i>Adenocystis utricularis</i> (Bory) Skottsberg	Penguin Island Punta Plaza
Ascoseiraceae	<i>Ascoseira mirabilis</i> Skottsberg	Penguin Island
Desmarestiaceae	<i>Desmarestia anceps</i> Montagne	EACF Penguin Island
	<i>Desmarestia antarctica</i> R.L.Moe & P.C.Silva	Ipanema
Rhodophyta		
Gracilariaceae	<i>Curdiea racovitzae</i> Hariot	EACF Punta Plaza
Callithamniaceae	<i>Georgiella confluens</i> (Reinsch) Kylin	Penguin Island
Gigartinaeae	<i>Gigartina skottsbergii</i> Setchell & N.L.Gardner	EACF Penguin Island Punta Plaza
	<i>Iridaea cordata</i> (Turner) Bory de Saint-Vincent	EACF Penguin Island Ipanema Punta Plaza
Delesseriaceae	<i>Myriogramme mangini</i> (Gain) Skottsberg	Punta Plaza Penguin Island
Palmariaceae	<i>Palmaria decipiens</i> (Reinsch) R.W.Ricker	Ipanema Yellow Point
Plocamiaceae	<i>Plocamium cartilagineum</i> (Linnaeus) P.S.Dixon	EACF Penguin Island Punta Plaza
Bangiaceae	<i>Pyropia endiviifolia</i> (A.Gepp & E.Gepp) H.G.Choi & M.S.Hwang	Penguin Island Punta Plaza

In addition, the cytotoxicity of the extracts was evaluated in cells of murine macrophages RAW 264.7, in order to determine their selectivity, considering that macrophages are mycobacteria host cells. The MIC₅₀, MIC₉₀ and IC₅₀ results for the extracts are showed in Table 2.

Table 2. Antimycobacterial, immunomodulatory, and cytotoxic activities of Antarctic seaweed used in this study.

Species	Collection Sites	Mtb H37Rv		Mtb M299		NO	Cytotoxicity
		MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
Chlorophyta							
<i>Monostroma hariotii</i>	Penguin Island	4.7 ± 1.2	73.6 ± 1.2	46.9 ± 0.7	>100	10.5 ± 1.1	38.3 ± 0.8
<i>Spongomorpha arcta</i>	Penguin Island	21.4 ± 1.6	>100	60.6 ± 0.8	>100	12.9 ± 1.3	35.2 ± 1.3
Ochrophyta							
<i>Adenocystis utricularis</i>	Penguin Island ^a	34.4 ± 1.9	>100	> 100	>100	23.2 ± 1.4	90.9 ± 1.2
	Penguin Island ^b	11.8 ± 1.2	>100	> 100	> 100	17.7 ± 1.2	34.9 ± 1.1
	Punta Plaza	> 100	>100	> 100	>100	6.3 ± 1.2	85.9 ± 1.2
<i>Ascoseira mirabilis</i>	Penguin Island	17.8 ± 0.5	>100	74.3 ± 0.9	>100	26 ± 1.4	27.2 ± 1.4
<i>Desmarestia anceps</i>	EACF	74.9 ± 1.8	>100	97.8 ± 1.4	>100	5.6 ± 0.9	41.5 ± 1.1
	Penguin Island	4.8 ± 2.0	>100	6.1 ± 2.2	>100	3.7 ± 1.2	9.7 ± 1.2
	Ipanema	6.4 ± 1.1	15.3 ± 1.2	74.5 ± 1.2	>100	6.4 ± 1.2	37.3 ± 1.1
<i>Desmarestia antarctica</i>	Ipanema	2.8 ± 0.3	98.5 ± 1.5	10.5 ± 0.6	>100	19.6 ± 0.8	42.4 ± 1.4
Rhodophyta							
<i>Curdiea racovitzae</i>	EACF	17.4 ± 1.1	>100	48.8 ± 1.7	>100	13.0 ± 1.3	> 100
	Punta Plaza	2.9 ± 0.3	42.6 ± 1.6	10.6 ± 0.6	>100	8.2 ± 1.2	70.1 ± 1.0
<i>Georgiella confluens</i>	Penguin Island	5.8 ± 0.8	40.2 ± 1.3	16.8 ± 0.9	>100	19.5 ± 1.3	42.4 ± 1.4
<i>Gigartina skottsbergii</i>	EACF	8.8 ± 0.9	75.5 ± 1.2	11.8 ± 0.9	>100	7.2 ± 1.2	42.3 ± 0.9
	Penguin Island	2.6 ± 0.4	>100	6.6 ± 1.3	>100	10.1 ± 1.3	> 100
	Punta Plaza	30.7 ± 0.9	>100	46.1 ± 2.0	>100	33.8 ± 1.0	> 100
<i>Iridaea cordata</i>	EACF	10.4 ± 1.5	>100	33.6 ± 1.5	>100	4.7 ± 1.2	45.6 ± 1.4
	Penguin Island	9.9 ± 0.2	64.7 ± 1.2	53.7 ± 0.4	>100	20.3 ± 1.4	> 100
	Punta Plaza	2.8 ± 0.2	>100	74.6 ± 1.5	>100	16.4 ± 1.1	37.3 ± 1.2
<i>Myriogramme mangini</i>	Ipanema	22.5 ± 1.2	>100	74.9 ± 1.3	>100	12.3 ± 0.7	61.8 ± 1.0
	Punta Plaza	73.5 ± 1.2	>100	78.9 ± 1.3	>100	10.1 ± 1.3	> 100

<i>Palmaria decipiens</i>	Penguin Island	41.1 ± 1.0	>100	88.4 ± 1.1	>100	6.2 ± 1.2	34.5 ± 1.4
	Ipanema	23.9 ± 1.5	>100	77.4 ± 0.7	>100	19.2 ± 0.3	> 100
	Yellow Point	> 100	>100	> 100	>100	10.1 ± 1.2	33.2 ± 0.9
<i>Plocamium cartilagineum</i>	EACF	11.2 ± 1.5	>100	13.1 ± 1.4	>100	6.3 ± 1.1	39.8 ± 0.7
	Penguin Island	93.1 ± 2.1	>100	> 100	>100	15 ± 1.0	42.6 ± 0.9
	Punta Plaza	13.6 ± 1.1	>100	35.0 ± 1.8	>100	7.3 ± 1.3	47.8 ± 1.1
<i>Pyropia endiviifolia</i>	Penguin Island	4.6 ± 0.8	78.7 ± 1.5	17.6 ± 0.8	>100	8.8 ± 1.0	42.6 ± 1.3
	Punta Plaza	2.1 ± 0.2	15.3 ± 1.3	3.2 ± 0.7	50.6 ± 1.3	6.8 ± 1.3	24.0 ± 0.9
Rifampicina		0.2 ± 0.1		1.1 ± 0.1			

^a young stage; ^b adult stage

The *Mycobacterium tuberculosis* strain H₃₇Rv is the most used control for *M. tuberculosis* in research laboratories. Except for *Adenocystis utricularis* (PP) and *Palmaria decipiens* (YP) extracts, all seaweed extracts, in their highest test concentration (100 µg/mL), showed activity against this strain. To identify products for further research as potential anti-TB compounds, the MIC₅₀ value should be less than 64 µg/mL or the growth inhibition should be greater than 75% at 12.5 mg/mL (COPP, 2003; HOU et al., 2019). This MIC value for positive samples varies between authors. According to Bueno (2012), extracts that have an MIC₉₀ less than 100 µg/mL and 25 µM or 10 µg/mL for pure compounds with a percentage of inhibition corresponding to 90% compared to the growth control, should be considered active. For this study, we considered the most active samples to be all those with MIC₅₀ values of less than 20 µg/mL.

According to our results, 62.1 % of the samples presented an MIC₅₀ below 20 µg/mL against the laboratory strain Mtb H₃₇Rv. The most potent extracts were those of *Pyropia endiviifolia* (PP), which showed the lowest values of MIC₅₀ and MIC₉₀, 2.1 ± 0.2 and 15.3 ± 1.3 µg/mL, respectively. The extracts of *G. skottsbergii* (E-PI), *Desmarestia antarctica* (I), *Iridaea cordata* (PP, PI), *Curdiea racovitzae* (PP), *Pyropia endiviifolia* (PI), *Monostroma hariotii* (PI), *Desmarestia anceps* (PI, I), *Georgiella confluens* (PI) also showed high antimycobacterial potential with MIC₅₀ values less than 10 µg/mL, whilst six algal extracts gave MIC₅₀ values between 10 and 20 µg/mL.

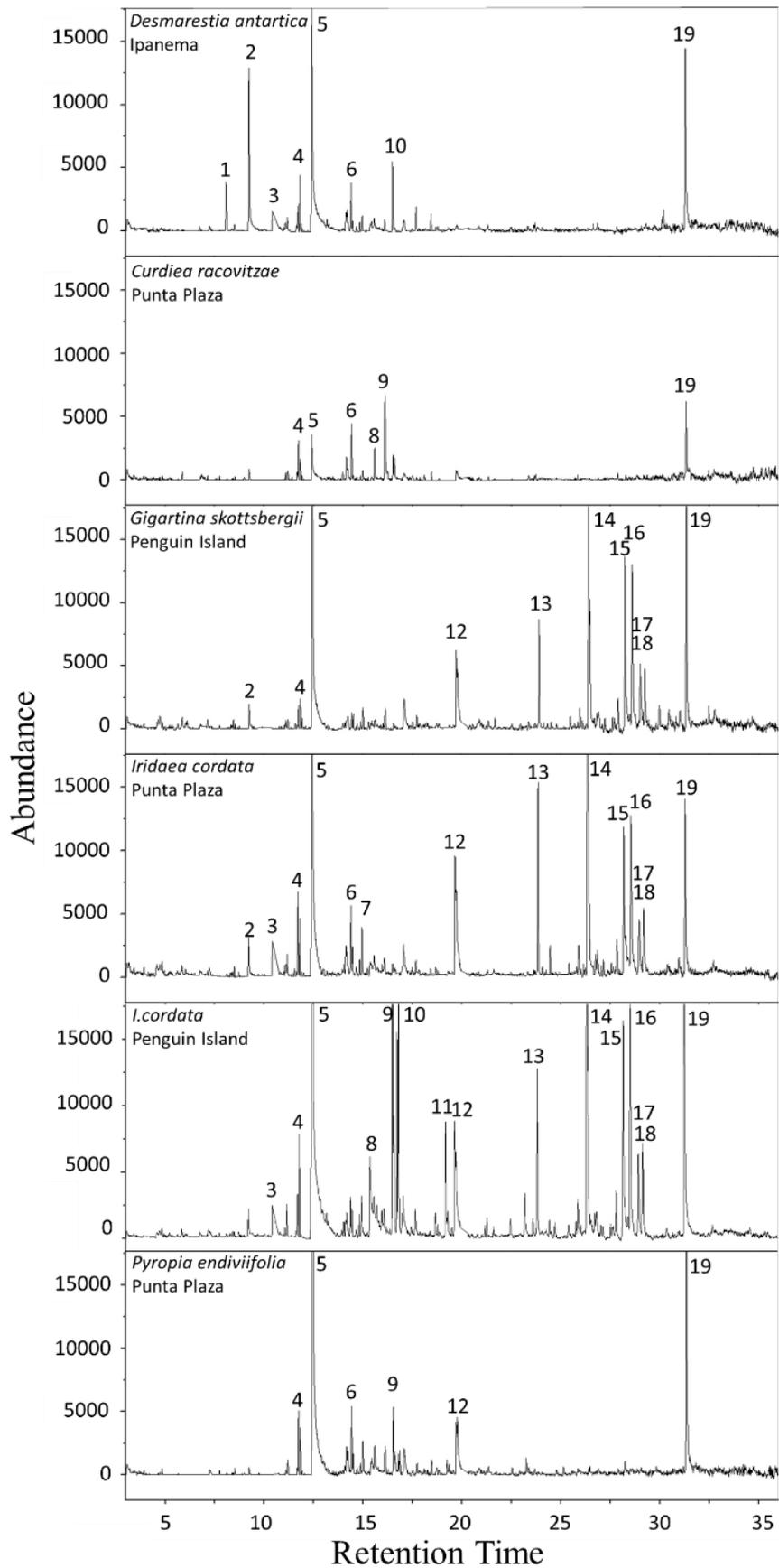


Figure 1. CGMS chromatograms of promising anti-TB seaweed extracts

Table 3. Principal constituents annotated by the GC-MS database of promising anti-TB seaweed samples

Peak	RT (min)	Similarity	Component annotated	Molecular Formula
1	8.095	66	Not identified	-----
2	9.218	92	Tetradecanoic acid	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
3	11.158	81	3-eicosene	C ₂₀ H ₄₀
4	11.800	87	Methyl 15-methylhexadecanoate	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
5	12.434	90	Ascorbic acid 2,6-dihexadecanoate	C ₃₈ H ₆₈ O ₈
		88	n-hexadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
6	14.392	83	2,4,4-trimethylcyclopentanol	C ₈ H ₁₆ O
7	14.942	80	Oxalic acid, allyl pentadecyl ester	C ₂₀ H ₃₆ O ₄
8	15.583	78	Not identified	-----
9	16.100	70	Not identified	-----
10	16.483	86	Hexanedioic acid, bis(2-methylpropyl) ester	C ₁₄ H ₂₆ O ₄
11	16.508	88	Isoamyl laurate	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
12	19.700	87	3,3-Dihydroxypropyl hexadecanoate	C ₁₉ H ₃₈ O ₄
13	23.892	89	3 β -cholesta-4,6-dien-3-ol	C ₂₇ H ₄₄ O
14	26.400	93	3 β -cholesta-5-en-3-ol	C ₂₇ H ₄₆ O
15	28.242	74	Not identified	-----
		74	Not identified	-----
16	28.600			-----
17	29.017	67	Not identified	-----
18	29.242	66	Not identified	-----
19	31.283	48	Not identified	-----

When, the Antarctica seaweed extracts were evaluated against the highly virulent *M. tuberculosis* strain of the Beijing genotype (strain M299), isolated from a TB patient in the Maputo province, Mozambique, 31% of all extracts showed an activity with an MIC₅₀ below 20 μ g/mL against this strain, showing the great potential of Antarctic algae as anti-

Tb agents. The extract of *Pyropia endiviifolia* (PP), was the most active, showing a MIC₅₀ 3.2 ± 0.7 µg/mL and MIC₉₀ 50.6 ± 1.3 µg/mL, for Mtb M299. Fungi isolated from this algae showed antibacterial and antiviral activity (FURBINO et al., 2014). Martins et al. (2018) evaluated extracts of *P. endiviifolia* using different solvents for their antimicrobial (Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeasts) and anticancer potential, however, they did not present antimicrobial activity and mild activity against squamous cell line carcinoma (A-431). The extracts of *Desmarestia anceps* (PI) and *Gigartina skottsbergii* (PI) also showed high antimycobacterial potential with MIC₅₀ values of 6.1 ± 2.2 and 6.6 ± 1.3 µg/mL, respectively. Studies using crude extract of *Desmarestia anceps* determined a high level of volatile halogenated organic compounds (VHOCs), compounds that have an important role in chemical defense (LATURNUS; WIENCKE; KLÖSER, 1996); other studies demonstrated antiherbivore (HUANG et al., 2006), anticancer (FRASSINI et al., 2019), and anti-inflammatory activity (MOLES et al., 2014). On the other hand, carrageenans isolated from the seaweed *G. skottsbergii* showed antiviral potential against human (MASCHEK et al., 2011; PUJOL et al., 2006) and animal (DIOGO et al., 2015) viruses and anticoagulant activity (CARLUCCI et al., 1997; PUJOL et al., 2006). Other six seaweed extracts, *D. antarctica* (I), *Curdiea racovitzae* (PP), *G. skottsbergii* (E), *Plocamium cartilagineum* (E), *Georgiella confluens* (PI) and *Pyropia endiviifolia* (PI) also gave MIC₅₀ values less than 20 µg/mL. There is very little knowledge about the antimycobacterial potential of seaweed. Most of the studies focus on a few genera of tropical or subtropical seaweed species their fractions and their pure compounds (KAMIMOTO, 1956; SPAVIERI et al., 2010; SÜZGEÇ-SELÇUK et al., 2011; VAL et al., 2001). There are no previous studies of antimycobacterial activity for the seaweeds used in this study, with the exception of *P. cartilagineum*. This species is widely distributed throughout the world, and its biological potential has been widely studied demonstrating antifeedant (ARGANDOÑA et al., 2002), antifouling (KÖNIG; WRIGHT; DE NYS, 1999; SAKATA et al., 1991), antimicrobial (KÖNIG; WRIGHT; LINDEN, 1999), antimycobacterial (SARAVANAKUMAR, 2006) and insecticidal (WATANABE et al., 1990) activities. König et al. (2000) evaluated 39 compounds isolated from marine organism against *M. tuberculosis* and *M. avium*, among which, a cyclic monoterpene isolated from the Antarctic seaweed *P. cartilagineum* showed activity against the two strains (MICs 32 and 64 µg/ mL, respectively). Sevak (2012) evaluated the algicidal and antifouling potential of 11 Antarctic seaweeds, among them, *C. racovitzae* showed antifouling activity and *D. antarctica* and *G. confluens* presented

algicidal activity. In addition, *C. racovitzae* also presented antioxidant and photoprotective activity (RANGEL, 2019).

To exclude the possibility that the inhibitory effects of the samples studied were due to cytotoxicity, the viability of macrophages was monitored through the ability of macrophages to metabolize MTT in formazan. Taking into account that some drugs with antimycobacterial activity may present toxicity against normal cells causing damage over time (HORSBURGH; BARRY; LANGE, 2015), it is important to evaluate the cytotoxic activity of extracts in normal cells. Macrophages were chosen because they are the host cells of mycobacteria.

The IC₅₀ values of cytotoxicity varied between 9.7 ± 1.2 and >100 $\mu\text{g/mL}$. *Desmarestia anceps* (PI) extract was the most toxic sample with IC₅₀ of 9.7 ± 1.2 $\mu\text{g/mL}$. The extracts of *Pyropia endiviifolia* (PP) and *Ascoseira mirabilis* (PI) exhibited moderate cytotoxic effects with IC₅₀ of 24.0 ± 0.9 and 27.2 ± 1.4 $\mu\text{g/mL}$, respectively. All of extracts presented weak cytotoxicity, except for six extracts (*Curdiea racovitzae* (E), *Gigartina skottsbergii* (PI, PP), *Iridaea cordata* (PI), *Myriogramme mangini* (PI) and *Palmaria decipiens* (I)) that did not show significant toxicity.

The relationship between MIC₅₀ and IC₅₀ allowed the establishment of the Selectivity Index (SI), which is a relative measure that relates the antimycobacterial effect and the cytotoxic effect (MOO-PUC; ROBLEDO; FREILE-PELEGRÍN, 2009). A selectivity index (SI, IC₅₀/ MIC₅₀) greater than 10 has been used as a benchmark to screen anti-TB compounds which have the potential for further development (HOU et al., 2019; ORME, 2001). Therefore, a higher SI indicates a higher selectivity for bacteria and less cytotoxicity for the cell line.

Here, six extracts obtained from *Desmarestia antarctica* (I), *Curdiea racovitzae* (PP), *Gigartina skottsbergii* (PI), *Iridaea cordata* (PI, I) and *Pyropia endivifolia* (PP) showed SI > 10 and may be considered promising against Mtb H₃₇Rv (drug sensitive virulent reference strain). The seaweed *I. cordata* have shown anti-cancer activity against different cell lines (FRASSINI et al., 2019; KIM et al., 2016; MARTINS et al., 2018; PEREIRA et al., 2015) and antileishmanial activity (RANGEL et al., 2019). Other extracts, such as in the case of *P. endiviifolia* (PI) and *Monostroma hariotii* (PI) showed an SI close to 10 and could also be investigated, considering that the selectivity could be enhanced with the bioassay-guided fractionation steps.

In the case of the hypervirulent strain Mtb M299, only the extract of *G. skottsbergii* (PI) showed an important activity with an SI greater than 15. Other extracts that stood out were those of the seaweed *C. racovitzae* (PP) and *P. endiviifolia* (PP), with a SI of 6.61 and 7.50, respectively.

Additionally, inflammation is strongly involved in the pathogenesis of most infectious diseases, including TB. The treatment of TB is based on the use of antimycobacterial drugs, however the most severe forms of TB, require additional anti-inflammatory therapy to prevent excessive inflammation. A combination of these properties in one compound could provide additional therapeutic benefits (BIÁ VENTURA et al., 2015). Here, the immunomodulatory properties of Antarctica seaweed extracts, our first efforts focused on the inflammatory mediator, were evaluated according to the capacity to inhibit the production of NO induced in macrophages RAW 264.7 by bacterial LPS. The LPS simulates an infection and promotes the activation of macrophages, leading to the activation of transcription factors and the synthesis of proteins that trigger the production of NO, in addition to other molecules. During the immune response for tuberculosis, these inflammatory mediators play an important role allowing macrophages the ability to eliminate phagocyte bacilli (BENAVIDES; PINZÓN, 2018). However, pro-inflammatory mediators, like NO, TNF- α and IL-1 β are highly produced in severe tuberculosis and are associated with lung tissue damage. And, in these specific cases, mainly related to MDR and XDR strains, the immunopathology adjuvant control is desired and recommended (VENTURA et al., 2015). In this context, as some samples were active against Mtb M299 – a MDR strain, NO was chosen as a trigger method to verify if seaweeds samples could present a dual-activity, before a more complete cytokines evaluation.

All extracts showed a NO inhibition greater than 89% when tested at maximum concentration, except for the extract of the seaweed *Gigartina skottsbergii* (PP), which showed a maximum inhibition $68.17 \pm 0.8\%$. The extracts of *Desmarestia anceps* (PI) and *Iridaea cordata* (E) were the most active, with IC₅₀ of 3.7 ± 1.2 and 4.7 ± 1.2 $\mu\text{g/mL}$. All active extracts against *M. tuberculosis* showed moderate to high NO inhibitory capacity, showing dual-activity, and can be used in the treatment of severe TB.

The samples with SI >10 presented an IC₅₀ between 6.3 ± 1.2 and 20.3 ± 1.4 $\mu\text{g/mL}$, with the extracts of *Curdiea racovitzae* and *Pyropia endiviifolia* being those that showed a

greater inhibition. These samples are excellent candidates for the search of substances that can be used in the dual treatment of severe tuberculosis (HOU et al., 2019). These results are relevant, and are useful to determine which samples would have their immunomodulatory profile dept.

These results demonstrate that some of the studied extracts have compounds with potential against tuberculosis, for this reason, in order to characterize the substances in the active extracts, the six most active extracts had their chemical profiles evaluated by Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). The chromatograms of the most active samples are shown in Figure 1, and the main constituents suggested by the GC-MS database are shown in Table 3.

Among the classes of metabolites produced by algae, lipids and their derivatives play an important role in the physiological and ecological functions of these organisms. The analysis of the chemical profiles showed substances belonging to different classes of natural products. In all samples, mainly fatty acids and sterols were identified, corroborating data from the literature of other studies with Antarctic seaweeds (FRASSINI et al., 2019; PACHECO et al., 2018; SANTOS et al., 2017). Studies have shown that lower temperatures generally lead to a higher degree of unsaturation of fatty acids in marine organisms (DA GAMA et al., 2008; DA SILVA FILHO, 2018). Santos et al. (2017) determined the chemical profile of some species of Antarctic red algae, finding a high concentration of PUFA and saturated fatty acids (SFA) in the species *Palmaria decipiens*, *Pyropia endiviifolia* and *Iridaea cordata*, which can offer benefits for human health. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) are known for their anti-inflammatory, anti-cancer potential and help in heart disease. Methyl ester of hexadecenoic acid, ascorbic acid, and an unidentified substance, with retention time 31.283 minutes, were identified in all samples. The extracts of *G. skottsbergii* and *I. cordata* presented the same substances (12-18) with retention times between 19 and 30 minutes, among which were identified a hexadecenoic acid methyl ester and two cholesterol. Fatty acids and sterols, in addition to having several pharmacological properties such as antibacterial, anti-inflammatory, anti-tumor, antioxidant activity, antiparasitic and hypocholesterolemic potential and in the prevention of heart disease (BHAGAVATHY et al, 2011; KASANA et al., 2015; TEIXEIRA et al., 2019), can also have a significant ecological role acting in the chemical defense against herbivory (BLUNT et al., 2016; PEREIRA et al., 2003). Cholesterol showed anti-aging and

neuroprotective, anti-inflammatory, cytotoxic, antifungal properties (BLUNT et al., 2016), antitumor activity (MAYER; GUSTAFSON, 2003) and antimicrobial (AL-FADHILI, 2008; THANIGAIVEL et al., 2015).

Three of the most active samples were collected in Punta Plaza (*Curdiea racovitzae*, *Iridaea cordata* and *Pyropia endiviifolia*), two were collected in Penguin Island (*Gigartina skottsbergii* and *I. cordata*) and one of them was collected in Ipanema (*Desmarestia antarctica*). The extract of *Iridaea cordata* showed a great complexity of compounds with the greatest concentration and abundance of compounds, meanwhile the extracts of *Curdiea racovitzae* and *Pyropia endiviifolia* showed the lowest abundance of substances. It can be seen that the chemical diversity and antimycobacterial activity of the seaweeds used in this study is not only influenced by their gender and species, but also by their geographical distribution. The chemical and biological variations found in populations of the same species collected in different locations, may be due to the rate of nutrients, the movement of water, rapid changes in light intensity, as well as relationships between seaweeds and their epiphytic bacteria or fungi, in addition to the interactions with herbivores and the impact of predators at the time they were collected (HURD et al., 2014). The significant variations in secondary metabolites have been observed in other studies with seaweeds of the same species collected in different locations (GERWICK, 1985; OLIVEIRA et al., 2013; TAYLOR et al., 2003), these variations can occur even in species collected in the same place, with a variation of one day between collections (STIRK; REINECKE; VAN STADEN, 2007).

There are few studies that assess the antimycobacterial potential of seaweed, and even fewer are the studies that assess the potential biotechnological potential of Antarctica seaweed. The present study was the first to evaluate the antimycobacterial potential of Antarctic seaweed. The antimycobacterial activity could be due to the compounds found by GC-MS analysis, such as fatty acids and their esters derivatives or their synergistic effect. In addition, crude extracts may even have other polar compounds, which have not yet been identified. Therefore, Antarctic seaweed could be used to identify and isolate new potent antimycobacterial compounds.

References

- AL-FADHILI, A. A. Bioactivity and structure of metabolites from marine organisms. India. 2008.
- AMSLER, C. D. et al. Potential chemical defenses against diatom fouling in Antarctic macroalgae. *Botanica Marina*, v. 48, n. 4, 2005.
- ARGANDOÑA, V. H. et al. Antifeedant effects of marine halogenated monoterpenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 24, p. 7029–7033, 2002.
- ARUNKUMAR, K.; SIVAKUMAR, S. R.; RENGASAMY, R. Review on bioactive potential in seaweeds (marine macroalgae): A special emphasis on bioactivity of seaweeds against plant pathogens. *Asian Journal of Plant Sciences*, v. 9, n. 5, p. 227–240, 2010.
- AVILA, C. Ecological and pharmacological activities of Antarctic marine natural products. *Planta Medica*, v. 82, n. 09/10, p. 767–774, 2016.
- BARCELLOS MARINI, M. et al. Cytotoxic activity of halogenated sesquiterpenes from *Laurencia dendroidea*. *Phytotherapy research: PTR*, v. 32, n. 6, p. 1119–1125, 2018.
- BENAVIDES, M. C.; PINZÓN, A. Oxido nítrico: Implicaciones fisiopatológicas. v. 36, p. 45–52, 2018.
- BERNARDI, J. et al. Preliminary data of antioxidant activity of green seaweeds (*Ulvophyceae*) from the Southwestern Atlantic and Antarctic Maritime islands. *Hidrobiológica*, v. 26, n. 2, p. 233–239, 2016.
- BHAGAVATHY, S.; SUMATHI, P.; JANCY SHERENE BELL, I. Green algae *Chlorococcum humicola*. A new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 1, n. 1, p. S1–S7, 2011.
- BIÁ VENTURA, T. L. et al. Nitric oxide production inhibition and anti-mycobacterial activity of extracts and halogenated sesquiterpenes from the brazilian red alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh. *Pharmacognosy Magazine*, v. 11, n. Suppl 4, p. S611-618, 2015.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 33, n. 3, p. 382–431, 2016.
- BORNANCIN, L. et al. Chemical mediation as a structuring element in marine gastropod predator-prey interactions. *Natural Product Reports*, v. 34, n. 6, p. 644–676, 2017.
- BUENO, J. Extractos vegetales y aceites esenciales como fuente de nuevos medicamentos antituberculosos. In: *Plantas Aromáticas y Aceites Esenciales: Estudio y Aplicaciones*. Universidad Industrial de Santander, p. 217–235, 2012.
- CAMPBELL, N. A.; URRY, L.; REECE, J. B. *Biología*. Madrid: Médica Panamericana, 2010.
- CARLUCCI, M. J. et al. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation

- between structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 20, n. 2, p. 97–105, abr. 1997.
- COPP, B. R. Antimycobacterial natural products. *Natural Product Reports*, v. 20, n. 6, p. 535, 2003.
- CRUCES, E.; HUOVINEN, P.; GÓMEZ, I. Interactive effects of UV radiation and enhanced temperature on photosynthesis, phlorotannin induction and antioxidant activities of two sub-Antarctic brown algae. *Marine Biology*, v. 160, n. 1, p. 1–13, 2013.
- DA GAMA, B. A. P. et al. Antifouling activity of natural products from Brazilian seaweeds. *Botânica Marina*, v. 51, n. 3, 2008.
- DA SILVA FILHO, I. J. Estudo bioguiado da macroalga marinha da Antártica *Desmarestia menziesii* para isolamento de substâncias biológicas. Dissertação (Mestrado)—São Paulo: Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2018.
- DAHMS, H.; DOBRETISOV, S. Antifouling compounds from marine macroalgae. *Marine Drugs*, v. 15, n. 9, p. 265, 2017.
- DIOGO, J. V. et al. Antiviral activity of lambda-carrageenan prepared from red seaweed *Gigartina skottsbergii* against BoHV-1 and SuHV-1. *Research in Veterinary Science*, v. 98, p. 142–144, 2015.
- DONG, M.; PFEIFFER, B.; ALTMANN, K.-H. Recent developments in natural product-based drug discovery for tuberculosis. *Drug Discovery Today*, v. 22, n. 3, p. 585–591, 2017.
- DOS SANTOS SOUZA MARINHO, R. et al. Antiviral activity of 7-keto-stigmasterol obtained from green Antarctic algae *Prasiola crispera* against equine herpesvirus 1. *Journal of Applied Phycology*, v. 29, n. 1, p. 555–562, 2017.
- FRASSINI, R. et al. Chemical characterization and cytotoxic activity of Antarctic macroalgae extracts against colorectal cancer. *Advances in Biological Chemistry*, v. 09, n. 05, p. 167–177, 2019.
- FURBINO, L. E. et al. Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae Across the Antarctic Peninsula. *Microbial Ecology*, v. 67, n. 4, p. 775–787, 2014.
- GERWICK, W. Chemical variation in the tropical seaweed *Styopodium zonale* (dictyotaceae). *Phytochemistry*, v. 24, n. 6, p. 1279–1283, 1985.
- GOMEZ-FLORES, R. et al. Determination of MICs for *Mycobacterium avium*-M. intracellulare complex in liquid medium by a colorimetric method. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 7, p. 1842–1846, 1995.
- HAY, M. E. Marine Chemical Ecology: Chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, v. 1, n. 1, p. 193–212, 2009.
- HORSBURGH, C. R.; BARRY, C. E.; LANGE, C. Treatment of Tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 22, p. 2149–2160, 2015.

- HOU, X.-M. et al. Marine natural products as potential anti-tubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 165, p. 273–292, 2019.
- HURD, C. L. et al. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, 2014.
- KAMIMOTO, K. Antibacterial substances extracted from seaweeds. Effects of extracts from seaweeds on the growth of some acid-fast bacteria. *Nippon Saikingaku Zasshi*, v. 11, p. 307–313, 1956.
- KASANAHA, N. et al. Antibacterial Compounds from Red Seaweeds (Rhodophyta). *Indonesian Journal of Chemistry*, v. 15, n. 2, p. 201–209, 2015.
- KIM, H. J. et al. Anticancer Activity of Sulfated Polysaccharides Isolated from the Antarctic Red Seaweed *Iridaea cordata*. *Ocean and Polar Research*, v. 38, n. 2, p. 129–137, 2016.
- KIM, S.-K.; CHOJNACKA, K. *Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications*. John Wiley & Sons, 2015.
- KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; DE NYS, R. Halogenated Monoterpenes from *Plocamium costatum* and Their Biological Activity. *Journal of Natural Products*, v. 62, n. 2, p. 383–385, 1999.
- KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; LINDEN, A. *Plocamium hamatum* and its monoterpenes: chemical and biological investigations of the tropical marine red alga. *Phytochemistry*, v. 52, n. 6, p. 1047–1053, 1999.
- KÖNIG, G.; WRIGHT, A.; FRANZBLAU, S. Assessment of Antimycobacterial Activity of a Series of Mainly Marine Derived Natural Products. *Planta Medica*, v. 66, n. 04, p. 337–342, 2000.
- MACHADO, F. L. DA S. et al. Chemical diversity and antileishmanial activity of crude extracts of *Laurencia* complex (Ceramiales, Rhodophyta) from Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, n. 6, p. 635–643, 2014.
- MARTINS, C. D. L. et al. Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. *Journal of Applied Phycology*, v. 25, n. 4, p. 1179–1187, 2013.
- MARTINS, R. M. et al. Macroalgae Extracts from Antarctica Have Antimicrobial and Anticancer Potential. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 8, 2018.
- MASCHEK, J. A. et al. The Pursuit of Potent Anti-influenza Activity from the Antarctic Red Marine Alga *Gigartina skottsbergii*. In: GANG, D. R. (Ed.). *The Biological Activity of Phytochemicals*. New York, NY: Springer New York, 2011. p. 1–12.
- MATHAYAN, M.; SUNDAR, R.; ANBARASU, S. Antimycobacterial activity of marine *Sargassum swartzii* extracts against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 130, 2018.
- MAYER, A. M. S.; GUSTAFSON, K. R. Marine pharmacology in 2000: Antitumor and cytotoxic compounds. *International Journal of Cancer*, v. 105, n. 3, p. 291–299, 2003.
- MOO-PUC, R.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRÍN, Y. Actividad citotóxica y antiproliferativa *in vitro* de macroalgas marinas de Yucatán, México. *Ciencias marinas*, v. 35, n. 4, p. 345–358, 2009.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MYSTIKOU, A. et al. Seaweed biodiversity in the south-western Antarctic Peninsula: surveying macroalgal community composition in the Adelaide Island/Marguerite Bay region over a 35-year time span. *Polar Biology*, v. 37, n. 11, p. 1607–1619, 2014.
- NAVARRO, N. P.; HUOVINEN, P.; GÓMEZ, I. Stress tolerance of Antarctic macroalgae in the early life stages. *Revista Chilena de Historia Natural*, v. 89, n. 1, 2016.
- NOCCHI, N. et al. Detection of a chemical cue from the host seaweed *Laurencia dendroidea* by the associated mollusc *Aplysia brasiliiana*. *PLOS ONE*, v. 12, n. 11, 2017.
- OLIVEIRA, A. S. et al. Inter- and intrapopulation variation in the defensive chemistry of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia*, v. 52, n. 2, p. 130–136, 2013.
- OMS. Tuberculosis. Disponível em: <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>>. Acesso em: 28 jan. 2019.
- ORME, I. Tuberculosis Drug Screening Program. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 7, p. 1943–1946, 2001.
- PACHECO, B. S. et al. Cytotoxic Activity of Fatty Acids from Antarctic Macroalgae on the Growth of Human Breast Cancer Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 6, 2018.
- PAL, A.; KAMTHANIA, M. C.; KUMAR, A. Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds—A Review. *Open Access Library Journal*, v. 01, n. 04, p. 1–17, 2014.
- PARADAS, W. C. et al. A Novel Antifouling Defense Strategy from Red Seaweed: Exocytosis and Deposition of Fatty Acid Derivatives at the Cell Wall Surface. *Plant & Cell Physiology*, v. 57, n. 5, p. 1008–1019, 2016.
- PELLIZZARI, F. et al. Diversity and spatial distribution of seaweeds in the South Shetland Islands, Antarctica: an updated database for environmental monitoring under climate change scenarios. *Polar Biology*, v. 40, n. 8, p. 1671–1685, 2017.
- PEREIRA, C. M. P.; COLEPICCOLO, P.; OLIVEIRA DE SOUZA, P. Antitumor activity of extracts from Antarctic macroalgae. LAP Lambert Academic Publishing, 2015.
- PEREIRA, L.; NETO, J. M. *Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology*. CRC Press, 2014.
- PEREIRA, R. C. et al. Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. *Brazilian Journal of Biology*, v. 63, n. 4, p. 665–672, 2003.
- PUJOL, C. A. et al. Antiviral Activity of a Carrageenan from *Gigartina skottsbergii* against Intraperitoneal Murine Herpes simplex Virus Infection. *Planta Medica*, v. 72, n. 2, p. 121–125, 2006.

- RANGEL, K. C. et al. Antileishmanial activity of the Antarctic red algae *Iridaea cordata* (Gigartinales; Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, v. 31, n. 2, p. 825–834, 2019.
- RANGEL, K. C. Avaliação do potencial fotoprotetor e antioxidante de extratos de macroalgas vermelhas da Antártica. Doutorado em Medicamentos e Cosméticos—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2019.
- SACRISTÁN-SORIANO, O. et al. Potential chemical defenses of Antarctic benthic organisms against marine bacteria. *Polar Research*, v. 36, n. 1, 2017.
- SAKATA, K. et al. Chemical studies on feeding inhibitors for marine herbivores. Part II. Halogenated terpenes isolated from the red alga *Plocamium leptophyllum* as feeding inhibitors for marine herbivores. *Nippon Suisan Gakkaishi*, v. 57, n. 4, p. 743–746, 1991.
- SALVADOR-NETO, O. et al. Larvicidal Potential of the Halogenated Sesquiterpene (+)-Obtusol, Isolated from the Alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiaceae: Rhodomelaceae), against the Dengue Vector Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). *Marine Drugs*, v. 14, n. 2, 2016.
- SANCHEZ, R. A. Antártida: introducción a un continente remoto. Editorial Albatros, 2007.
- SANTOS, M. A. Z. et al. Antarctic red macroalgae: a source of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Applied Phycology*, v. 29, n. 2, p. 759–767, 2017.
- SARAVANAKUMAR, D. Antimycobacterial activity of the red algae *Gelidium pristoides*, *Plocamium corallorhiza* and *Polysiphonia virgata*. *Pharmaceutical Biology*. Doctor Thesis. University of Cape Town, 2006.
- SARAVANAKUMAR, D. E. M. et al. Antimycobacterial Activity of the Red Alga *Polysiphonia virgata*. *Pharmaceutical Biology*, v. 46, n. 4, p. 254–260, 2008.
- SCHORIES, D.; KOHLBERG, G. *Marine Wildlife King George Island Antarctica*. 1° edition ed. Dirk Schories Publications, 2016.
- SEVAK, H. P. Potential chemical defenses against diatom fouling in macroalgae from the Antarctic Peninsula: insights from bioassay guided fractionation. PhD Thesis. University of Alabama at Birmingham, Graduate School, 2010.
- SEVAK, H. P. et al. Algicidal activity and potential antifouling defenses in macroalgae from the western Antarctic Peninsula including probable synergistic effects of multiple compounds. *Botanica Marina*, v. 55, n. 3, 2012.
- SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*, v. 16, n. 4, p. 245–262, 2004.
- SOARES, D. C. et al. The Brown Alga *Styopodium zonale* (Dictyotaceae): A Potential Source of Anti-Leishmania Drugs. *Marine Drugs*, v. 14, n. 9, 2016.
- SPAVIERI, J. et al. Antimycobacterial, antiprotozoal and cytotoxic potential of twenty-one brown algae (phaeophyceae) from British and Irish waters. *Phytotherapy Research*, v. 24, n. 11, p. 1724–1729, 2010.

- STIRK, W. A.; REINECKE, D. L.; VAN STADEN, J. Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, v. 19, n. 3, p. 271–276, 2007.
- SÜZGEÇ-SELÇUK, S. et al. Evaluation of Turkish seaweeds for antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic activities. *Phytotherapy Research*, v. 25, n. 5, p. 778–783, 2011.
- TABOADA, S. et al. Antitumoural activity in Antarctic and sub-Antarctic benthic organisms. *Antarctic Science*, v. 22, n. 05, p. 494–507, 2010.
- TAYLOR, R. B. et al. Intraspecific variation in palatability and defensive chemistry of brown seaweeds: effects on herbivore fitness. *Oecologia*, v. 136, n. 3, p. 412–423, 2003.
- TEBBEN, J. et al. Chemical mediation of coral larval settlement by crustose coralline algae. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 10803, 2015.
- TEIXEIRA, T. R. et al. Characterization of the lipid profile of Antarctic brown seaweeds and their endophytic fungi by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). *Polar Biology*, v. 42, n. 8, p. 1431–1444, 2019.
- THANIGAIVEL, S. et al. Differential solvent extraction of two seaweeds and their efficacy in controlling *Aeromonas salmonicida* infection in *Oreochromis mossambicus*: A novel therapeutic approach. *Aquaculture*, v. 443, p. 56–64, 2015.
- TIBERI, S. et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 7, p. e183–e198, 2018.
- TOTH, G. B.; PAVIA, H. Induced herbivore resistance in seaweeds: a meta-analysis. *Journal of Ecology*, v. 95, n. 3, p. 425–434, 2007.
- VAL, A. et al. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *International Microbiology*, v. 4, n. 1, p. 35–40, 2001.
- VEGA, S. G. DE LA; MERCURI, G. *Antártida: las leyes entre las costas y el mar*. Buenos Aires, Argentina: Contacto Silvestre: Dirección Nacional del Antártico, 2000.
- VENTURA, T. et al. Antimycobacterial and Anti-Inflammatory Activities of Substituted Chalcones Focusing on an Anti-Tuberculosis Dual Treatment Approach. *Molecules*, v. 20, n. 5, p. 8072–8093, 2015.
- WATANABE, K. et al. Two insecticidal monoterpenes, telfairine and aplysiaterpenoid A, from the red alga *Plocamium telfairiae*: Structure elucidation, biological activity, and molecular topographical consideration by a semiempirical molecular orbital study. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 3, p. 275–286, 1990.
- WIENCKE, C. et al. Life strategy, ecophysiology and ecology of seaweeds in polar waters. In: AMILS, R.; ELLIS-EVANS, C.; HINGHOFER-SZALKAY, H. (Eds.). *Life in Extreme Environments*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 213–244.

ZIMMER, R. K.; COMMINS, J. E.; BROWNE, K. A. Regulatory effects of environmental chemical signals on search behavior and foraging success. *Ecology*, v. 80, n. 4, p. 1432–1446, 1999.

ATIVIDADE ANTICÂNCER DE MACROALGAS MARINHAS ANTÁRTICAS

Com a finalidade de avaliar a atividade anticancerígena dos produtos naturais de macroalgas coletadas nas Ilhas Shetland do Sul, na Península Antártica, os extratos obtidos foram testados frente à linhagem de células tumorais HCT-116 (carcinoma de cólon humano). A obtenção de extratos e a parte química descrita foi desenvolvida no Laboratório Integrado de Química, NUPEM, UFRJ - *Campus* Macaé, sob orientação da Dra. Professora Angélica Ribeiro Soares. Os testes biológicos realizados foram feitos com colaboração da Dra. Professora Paula Christine Jimenez do Laboratório de Bioprospecção de Organismos Marinhos, da Universidade Federal de São Paulo, *Campus* Baixada Santista em São Paulo.

2.1. INTRODUÇÃO:

O câncer colorretal é uma patologia que afeta significativamente a humanidade e que, até hoje, apesar do desenvolvimento tecnológico, a implementação de novas terapias e avanços farmacológicos leva a uma alta mortalidade. O câncer colorretal em todo o mundo é uma das entidades neoplásicas mais importantes afetando tanto países em desenvolvimento como países subdesenvolvidos. O diagnóstico oportuno e a terapia adequada são essenciais para a sobrevivência dos pacientes e naqueles em que a morte é iminente, prestar cuidados que melhorem a qualidade de vida é um princípio fundamental no atendimento (CALVA; ACEVEDO, 2009).

A frequência do câncer colorretal teve um aumento progressivo nos países desenvolvidos ou industrializados e é atualmente a terceira principal causa de câncer no mundo. É responsável por uma incidência de aproximadamente 945.000 novos casos por ano e 492.000 mortes por ano em todo o mundo (PARRA et al., 2012). É o terceiro tipo de câncer diagnosticado com mais frequência em homens (8,0%) e em mulheres (8,2%), sendo também o terceiro com uma maior taxa de mortalidade tanto em homens (9,3%), quanto em mulheres (9,5%) (OMS, 2020). A maior incidência de câncer colorretal no mundo é encontrada nos Estados Unidos, Austrália / Nova Zelândia, Europa Ocidental e Japão, principalmente em homens. Na América do Sul, a incidência tende a ser média e, na África e Ásia, é baixa (CALVA; ACEVEDO, 2009).

De acordo com a base dos Registros de Câncer e do Sistema de Informações sobre Mortalidade, no Brasil, em 2020, o câncer colorretal continua sendo o terceiro tipo de câncer diagnosticado com mais frequência, com 17.760 casos novos em homens e o segundo em mulheres com 20.470 de casos novos, provocando aproximadamente 9.207 mortes em homens e 9.660 mortes de mulheres anualmente (INCA, 2020).

A grande maioria das neoplasias originárias do intestino grosso são adenocarcinomas epiteliais derivados de células epiteliais colunares na mucosa do cólon e do reto. Esses adenocarcinomas geralmente se originam de pólipos que resultam de proliferação e displasia. A grande maioria dos pólipos ocorre esporadicamente e em indivíduos idosos. Os tumores carcinoides do cólon e do reto são lesões do tipo carcinoma que ocorrem em muitas regiões do trato gastrointestinal, incluindo o apêndice e o reto (CALVA; ACEVEDO, 2009).

Nas últimas décadas, novas ferramentas foram incorporadas para um diagnóstico mais preciso da doença, o que permite esquemas terapêuticos mais individualizados e o manejo multidisciplinar tornou-se mais relevante, com tendências ao tratamento cirúrgico de entrada para tumores ressecáveis do cólon, seguidas de tratamento adjuvante quando indicado e; no caso do reto, cirurgia apenas em estágios iniciais e quimioterapia combinada e radioterapia, seguida de cirurgia em estágios mais avançados (PARRA et al., 2012).

Diversos tratamentos ou combinação deles podem ser utilizados dependendo do estágio em que o câncer colorretal se encontra. Entre os tratamentos mais utilizados, está o tratamento cirúrgico, a radioterapia e a quimioterapia, e a combinação de estes dois últimos é conhecida como quimiorradiação (PÁEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019).

A quimioterapia consiste no uso de drogas para tratar o câncer. O medicamento pode ser aplicado de várias maneiras, injetado oralmente na veia ou injetado diretamente em uma artéria. Os medicamentos mais comumente usados no tratamento do câncer colorretal são o 5-fluorouracil (5-FU), a capecitabina, o irinotecano, a oxaliplatina, a trifluridina e o tipiracil. O mecanismo de ação do 5-FU depende da interferência da enzima timidilato sintase em pelo menos duas fases diferentes do ciclo celular. A incorporação de fluorouracil no DNA e no RNA das células cancerígenas do cólon é a chave para sua atividade. No entanto, o fluorouracil tem uma taxa de resposta de 10 a 15% no câncer colorretal em estágio avançado. Além disso, o uso desse tipo de medicamento apresenta

certas desvantagens devido à sua alta toxicidade e sua ação não específica, provocando uma série de efeitos colaterais (PÁEZ-HERNÁNDEZ et al., 2019).

Devido aos efeitos adversos e à baixa taxa de sucesso dos tratamentos contra o câncer em estágios avançados, a busca por tratamentos alternativos que tenham maior especificidade e, portanto, eliminem ou minimizem os efeitos colaterais, continua sendo de extra importância.

As células HCT-116 são uma linhagem celular de câncer de cólon humano usada em pesquisas terapêuticas e exames de drogas. Possuem uma mutação no códon 13 do proto-oncogene KRAS e são alvos de transfecção adequados para pesquisas em terapia genética (ATCC, [s.d.]). O oncogene KRAS pertence à família de genes *ras* (H-ras, N-ras e K-ras); este oncogene proporciona informação que ajuda no prognóstico da agressividade e capacidade de recaída e metástases das células (PARRA et al., 2012). As células HCT-116 são usadas em uma variedade de estudos biomédicos envolvendo a proliferação do câncer de cólon e os inibidores correspondentes. As células têm uma morfologia epitelial e podem sofrer metástases em modelos de xenoinxertos *in vitro* (RAJPUT et al., 2008).

As macroalgas marinhas são conhecidas por produzirem diferentes metabólitos secundários estruturalmente diversos dotados com atividades biológicas relevantes e potenciais aplicações em diversas áreas (RIBEIRO et al., 2012), entre elas incluídas a atividade antibacteriana e antiproliferativa (FERNÁNDEZ; HERNÁNDEZ; REGUEIRA, 2015). Diversos estudos tem demonstrado o potencial das macroalgas como fontes de medicamentos anticâncer; utilizando diversos modelos *in vitro* e *in vivo* (FERNÁNDEZ; HERNÁNDEZ; REGUEIRA, 2015; MURPHY et al., 2014; WIJESINGHE; JEON, 2012)

Portanto, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade anticancerígena de macroalgas coletadas nas Ilhas Shetland do Sul, na Península Antártica frente à linhagem de células tumorais HCT-116 (câncer de cólon).

2.2. MATERIAL E MÉTODOS:

2.2.1. Locais e Organismos de Estudo

Foram coletadas 29 amostras de algas marinhas durante a XXXVI expedição que integra o Programa Antártico Brasileiro, durante o verão austral de 2017 (novembro a dezembro) em diferentes locais nas Ilhas Shetlands do Sul, na Península Antártica. O material foi

classificado, identificado ao nível de espécies de acordo com análises macro e micromorfológicas, acondicionado em sacos plásticos, armazenado em freezer a -20 °C e transportado para o Brasil.

2.2.2. Preparação de extratos de algas

No Brasil, as amostras congeladas foram liofilizadas e homogeneizadas com um ajuda de um liquidificador antes da extração, utilizando uma mistura de MeOH: AcOEt (1:1) e um aparelho de ultrassom (por 20 min). Após um intervalo de 72 horas, o material foi filtrado e extraído novamente. Este procedimento foi repetido 3 vezes, todos os solventes foram combinados e evaporados sob pressão reduzida para produzir extratos lipofílicos.

2.2.3. Cultivo celular

A linhagem HCT-116 (CCL-247), obtida da ATCC (American Type Culture Collection), é um carcinoma colorretal humano e foi utilizada para avaliação da citotoxicidade dos extratos obtidos das macroalgas marinhas. As células foram mantidas em garrafas de cultura de 75 cm² contendo meio de cultura RPMI e 10% de SFB (soro fetal bovino) suplementado com 1% de antibióticos (penicilina + estreptomicina) em incubadora a 37°C, atmosfera de CO₂ a 5% e umidade relativa de 95%. Sempre que necessário, as células foram repicadas na proporção de 1:6 a fim de manter a cultura em crescimento exponencial.

2.2.4. Ensaio do MTT:

O teste de MTT consiste de uma análise colorimétrica que quantifica indiretamente as células viáveis, baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetilazol-2-tiazolil)-2,5-difenil2H tetrazolina bromida (MTT), um composto de cor amarela, a formazan, de coloração púrpura, pela atividade da enzima succinil-desidrogenase presente nas mitocôndrias ativas das células vivas (MOSMANN, 1983).

2.2.4.1. Análise Quantitativa Preliminar:

Numa análise quantitativa inicial, os extratos foram diluídos em DMSO e testados em duas concentrações, 5 e 50 µg/mL, buscando identificar aqueles que possuem efeito antiproliferativo sobre a cultura de células HCT-116 (câncer de cólon). Para tanto, as células foram plaqueadas utilizando placas de 96 poços na concentração de 5 x 10⁴ células /mL, num volume de 200 µL por poço. Depois de 24h, tempo necessário à adesão das células à superfície dos poços, os extratos, previamente dissolvidos em DMSO, foram

adicionados aos poços na concentração final adequada (5 e 50 µg/mL) e incubados por um período de 72h. O grupo controle recebeu a mesma quantidade de DMSO, e a doxorrubicina foi adicionada em uma escala de concentração de 50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016 µg/mL sendo utilizada como controle positivo. Ao final deste período, o meio de cultura foi substituído por um novo meio (150 µL) contendo 0,5 mg/mL de MTT. Após 3 horas, o formazan foi dissolvido em 150 µL de DMSO e a absorbância foi medida usando um espectrofotômetro de placas (Spectra Count, Packard) no comprimento de onda de 570 nm. A análise quantitativa foi expressa a partir da porcentagem de inibição referente ao controle negativo, foram considerados ativos os extratos que inibiram acima de 75% a proliferação celular pelo menos na maior concentração.

2.2.4.1. Análise Quantitativa – Cálculo do IC₅₀:

Os extratos selecionados por sua citotoxicidade passaram para uma avaliação quantitativa, visando determinar o valor da concentração inibitória média (IC₅₀), a partir de uma curva concentração *versus* efeito. Para essa análise foi utilizado o extrato na concentração 50 µg/mL buscando identificar a relação dose x efeito sobre a cultura de células HCT-116. As células foram plaqueadas utilizando placas de 96 poços na concentração de 5×10^4 células /mL, num volume de 200 µL por poço. Depois de 24h, tempo necessário à adesão das células à superfície dos poços, os extratos selecionados para este teste foram adicionados em um gradiente de concentração (50, 10, 2, 0,4, 0,08, 0,016, 0,0032 µg/mL) e incubados por um período de 72 h. Como grupo controle foi utilizado DMSO e como controle positivo o quimioterápico doxorrubicina. Ao final deste período, o meio de cultura foi substituído por um novo meio (150 µL) contendo 0,5 mg/mL de MTT. Após 3 horas, o formazan foi dissolvido em 150 µL de DMSO e a absorbância foi medida utilizando um espectrofotômetro de placas (Spectra Count, Packard) no comprimento de ondas de 570 nm. A análise quantitativa foi realizada a partir de regressão não-linear; e foram considerados ativos os extratos que apresentaram uma IC₅₀ menor que 20. A quantificação dos resultados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 8.0. Para tanto, a partir dos valores de absorbância dos tratamentos das células apenas com o veículo de diluição DMSO (100% de células) foi determinado o percentual de células remanescente após cada tratamento a partir dos respectivos valores de absorbância.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

As substâncias de origem natural desempenham um papel muito importante na descoberta de novos medicamentos com atividade antitumoral (CARROLL et al., 2019). Nas últimas três décadas, a descoberta de metabólitos secundários com atividade biológica de macroalgas cresceu substancialmente, no entanto, de aproximadamente 25.000 espécies de algas descritas, apenas 15 são utilizadas biotecnologicamente em larga escala (RAJA et al., 2008). As macroalgas marinhas da Antártica se adaptaram a uma das condições mais adversas do planeta, sendo uma fonte promissora para a descoberta de substâncias com atividade anticâncer.

No nosso estudo foram avaliadas 26 extratos de macroalgas marinhas coletadas em cinco locais diferentes: A Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz (EACF), Punta Plaza, Ipanema e Yellow Point, na Baía do Almirantado na Ilha Rei George; e na Ilha Pinguim. Das algas coletadas 73,08 % foram algas vermelhas (Rhodophyta), 19,23 % algas pardas (Phaeophyta) e 7,69% algas verdes (Chlorophyta) (Figura 2.1). O efeito de 26 extratos coletados nos diferentes locais foi avaliado por seu potencial citotóxico frente à linhagem tumoral HCT-116 (câncer de cólon).

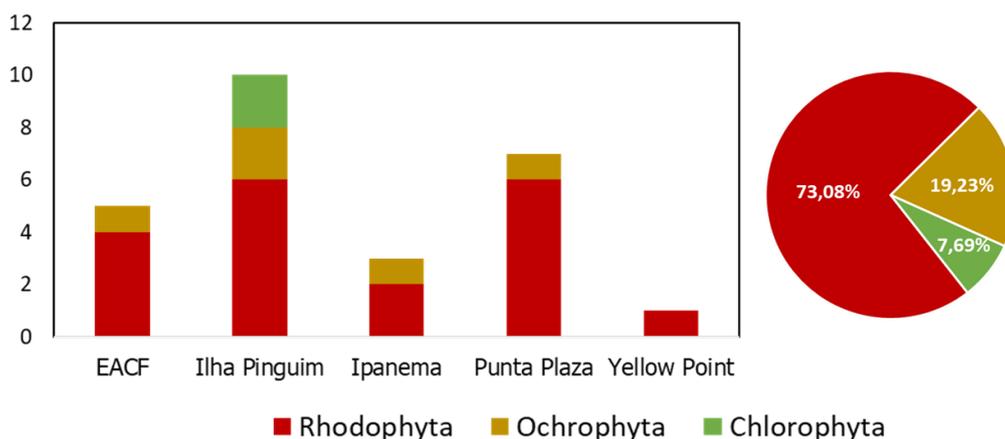


Figura 2.1. Gráfico em barras representando a quantidade de amostras coletadas por local. O gráfico de pizza apresenta a porcentagem total por filo das macroalgas coletadas.

Os extratos brutos de cada macroalga marinha foram testados inicialmente a partir do ensaio de MTT, contra a linhagem tumoral HCT-116 (câncer de cólon). Os extratos secos foram diluídos em DMSO numa concentração estoque de 10 mg/mL; para os testes foram definidas duas concentrações, 50µg/mL e 5µg/mL, e todos os testes foram realizados em duplicatas. Foram considerados ativos os extratos que apresentaram atividade inibitória igual ou superior a 75% do crescimento das células em cultura na concentração de 50

$\mu\text{g/mL}$ e igual ou superior a 50% do crescimento das células na menor concentração. Após as análises feitas, foi possível definir que 14 extratos (53,85%) apresentaram atividade inibitória contra a linhagem tumoral HCT-116 acima de 75% em ambas concentrações (50 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$) sendo que 4 extratos (15,38 %) apresentaram taxa inibitória acima de 50% na menor concentração, conforme mostrado na Figura 2.2.

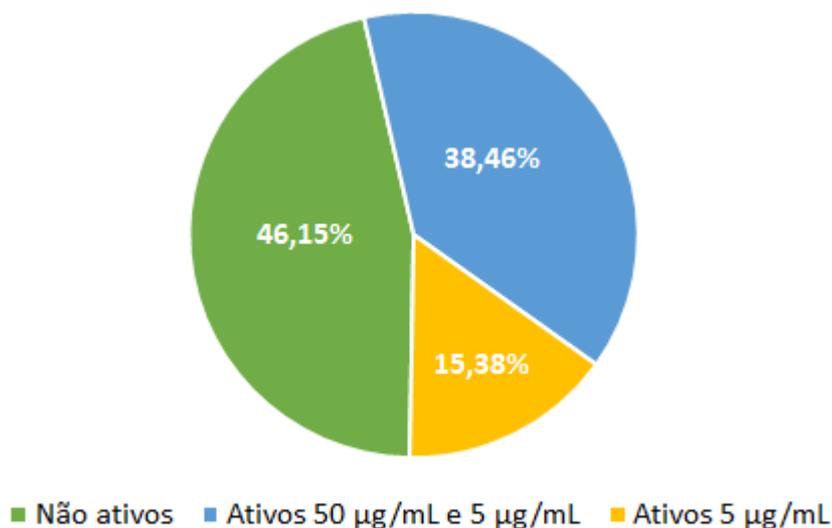


Figura 2.2. Porcentagem dos extratos brutos testados, separados entre extratos que não mostraram atividade, extratos que apresentaram atividade superior a 75% em ambas concentrações (50 $\mu\text{g/mL}$ e 5 $\mu\text{g/mL}$) e extratos considerados muito ativos por apresentar atividade superior a 50% na menor concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$.

O gráfico a seguir apresenta os resultados percentuais de inibição do crescimento das células em relação ao controle negativo (DMSO; 0% de inibição). O quimioterápico doxorrubicina (5 μM) foi utilizado como controle positivo (100% de inibição). Foram considerados ativos os extratos que inibirem pelo menos 75% do crescimento das células na maior concentração (em verde). Ainda mais interessantes foram aqueles que inibirem pelo menos 50% do crescimento das células na menor concentração (em azul). Os extratos das macroalgas *Ascoseira mirabilis*, *Georgiella confluens* e *Spongomorpha arcta* coletadas na Ilha Pinguim e o extrato de *Desmarestia anceps* coletada na EACF, foram os que mais destacaram por demonstrar capacidade de inibição celular acima de 50 % em ambas as concentrações testadas (Figura 2.3).

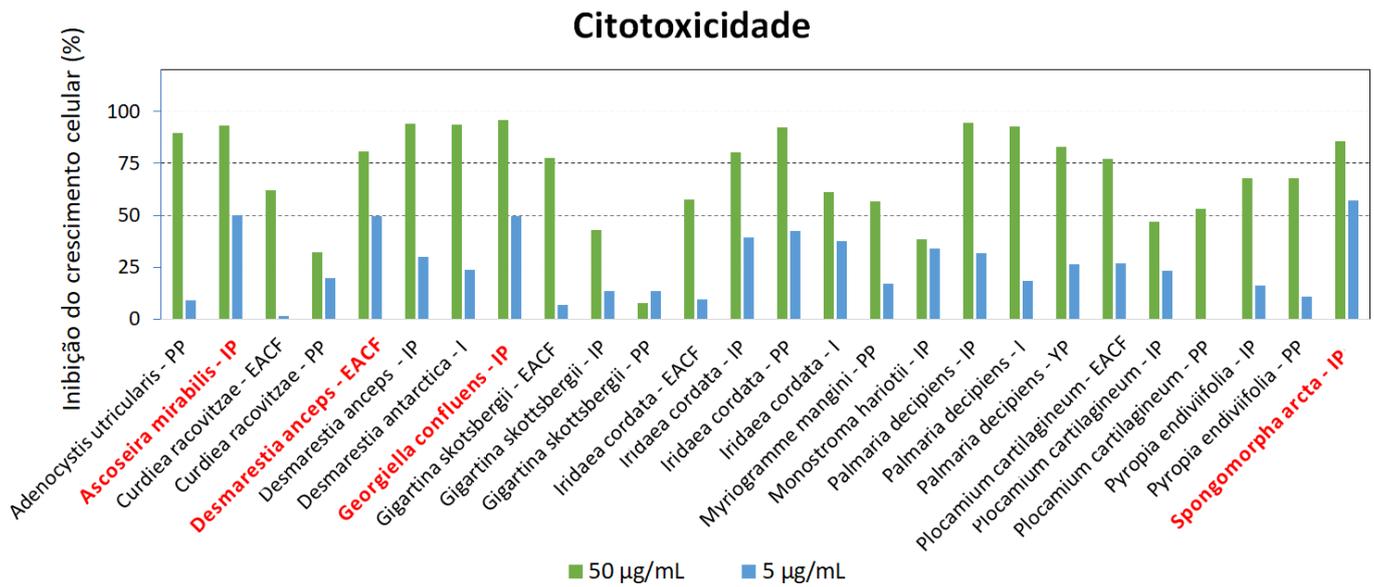


Figura 2.3. Inibição do crescimento de células HCT-116 (câncer de cólon), induzido pelos extratos obtidos das macroalgas marinhas nas duas diferentes concentrações testadas (50µg/mL em verde, e 5µg/mL em azul). EACF: Estação Antártica Brasileira Comandante Ferraz; I: Ipanema; IP: Ilha Pinguim; PP: Punta Plaza; YP: Yellow Point.

A Tabela 2.1 apresenta os resultados com os valores de Concentração Inibitória (IC₅₀), Intervalo de Confiança (CI95%), Coeficiente de determinação (R²) calculados a partir de uma regressão não-linear no software GraphPad Prism 8.0. O quimioterápico doxorrubicina foi utilizado como substância de referência. Menores valores de IC₅₀ correspondem aos extratos mais citotóxicos.

Tabela 2.1. Valores de IC₅₀, CI95% e R² dos 14 extratos que mostraram potencial anticâncer nas duas concentrações (50µg/mL e 5µg/mL), testados quantitativamente a partir do ensaio do MTT, utilizando as linhagens HCT-116 (câncer de cólon).

Especie	Local de coleta	IC ₅₀ (µg/mL)	CI 95%	R ²
Cholorophyta				
<i>Spongomorpha arcta</i>	Ilha Pinguim	6,40	muito amplo	0,5406
Ochrophyta				
<i>Adenocystis utricularis</i>	Punta Plaza	> 50*	-	-
<i>Ascoseira mirabilis</i>	Ilha Pinguim	35,50	muito amplo	0,4751
<i>Desmarestia anceps</i>	EACF	14,94	muito amplo	0,6732
<i>Desmarestia anceps</i>	Ilha Pinguim	15,76	12,71 – 19,68	0,9875
<i>Desmarestia antarctica</i>	Ipanema	45,35	31,45 – 77,57	0,8719

Rhodophyta				
<i>Georgiella confluens</i>	Ilha Pinguim	38,06	muito amplo	0,9764
<i>Gigartina skottsbergii</i>	EACF	10,18	muito amplo	0,5397
<i>Iridaea cordata</i>	Ilha Pinguim	9,08	muito amplo	0,4328
<i>Iridaea cordata</i>	Punta Plaza	31,89	22,05 – 46,41	0,9082
<i>Palmaria decipiens</i>	Ilha Pinguim	5,25	muito amplo	0,8009
<i>Palmaria decipiens</i>	Ipanema	20,76	10,76 – 46,54	0,7945
<i>Palmaria decipiens</i>	Yellow Point	39,89	23,93 – 104,7	0,7908
<i>Plocamium cartilagineum</i>	EACF	1,65	muito amplo	0,6001
Doxorrubicina		0,02 μ M	0,012 – 0,035	0,9154

Nos ensaios realizados na linhagem HCT-116, 13 extratos obtiveram valores da IC₅₀ que variaram de 1,65 a 45,35 μ g/mL; o extrato da macroalga marinha *Adenocystis utricularis* coletada em Punta Plaza atingiu um valor superior a 50 μ g/mL, este valor, gerado pelo programa de análise, esteve fora da gradiente de concentração realizada, e será testado novamente. Os valores dos CI 95% calculados de oito extratos também não foram considerados por superar os parâmetros aceitáveis (muito amplo), e alguns R² foram muito baixos, por tanto, estas amostras serão testadas novamente.

De acordo com o *National Cancer Institute* (NCI), sete extratos foram considerados relevantes por exibir uma IC₅₀ abaixo de 20 μ g/mL. Dentre eles, o extrato de macroalga *Plocamium cartilagineum* coletada na EACF destacou-se com uma IC₅₀ de 1,65 μ g/mL, seguido dos extratos das macroalgas *Palmaria decipiens* e *Spongomorpha arcta*, as duas coletadas na Ilha Pinguim, com IC₅₀ de 5,25 e 6,40 μ g/mL, respectivamente. As análises dos perfis químicos dos extratos mediante técnicas cromatográficas mostraram substâncias pertencentes a diferentes classes de produtos naturais, como ácidos graxos, esteróis e terpenos nas amostras ativas (Figura 2.4; Tabela 2.2), algumas das estruturas das substâncias majoritárias são representadas na Figura 2.5.

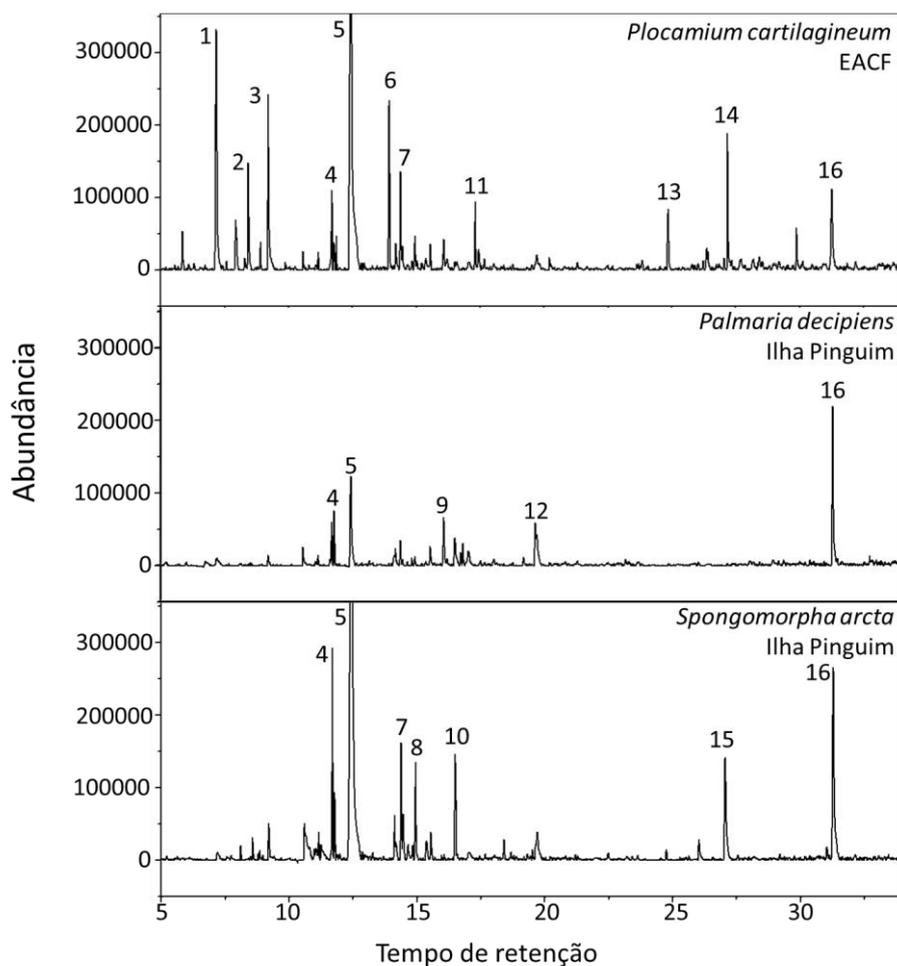
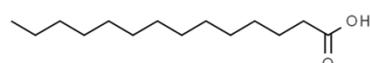


Figura 2.4. Cromatograma obtido dos extratos das amostras que apresentaram uma maior atividade citotóxica contra a linhagem de células tumorais HCT-116 (câncer de cólon) por CG-EM.

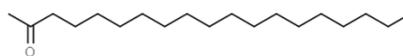
Tabela 2.2. Substâncias majoritárias das amostras que apresentaram uma maior atividade citotóxica contra a linhagem de células tumorais HCT-116 (câncer de cólon) por CG-EM.

Pico	TR (min)	Similaridade (%)	Substância sugerida	Fórmula molecular
1	7,396	69	Não identificada	-----
2	8,486	73	Não identificada	-----
3	9,253	93	Ácido tetradecanóico	$C_{14}H_{28}O_2$
4	11,724	84	(Z)-7-Hexadecenal	$C_{16}H_{30}O$
5	12,367	92	2,6 – hexadecanoato de L- (+) - ácido ascórbico	$C_{38}H_{68}O_8$
6	13,879	61	Não identificada	-----
7	14,418	77	Não identificada	-----

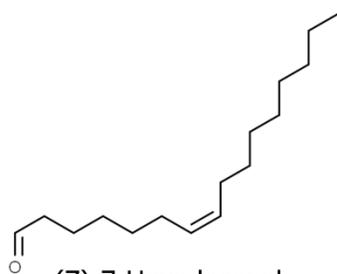
8	14,978	79	Não identificada	-----
9	16,107	74	Não identificada	-----
10	16,515	93	Acetilcitrato de tributilo	$C_{20}H_{34}O_8$
11	17,356	88	2-Nonadecanona	$C_{19}H_{38}O$
12	19,701	87	β -monoglicérido de ácido palmítico	$C_{19}H_{38}O_4$
13	25,087	60	Não identificada	-----
14	27,405	77	Não identificada	-----
15	27,297	62	Não identificada	-----
16	31,323	47	Não identificada	-----



Ácido tetradecanóico



2-Nonadecanona



(Z)-7-Hexadecenal



β -monoglicérido de ácido palmítico

Figura 2.5. Estrutura de algumas das substâncias majoritárias sugeridas pelas bibliotecas NIST 05 e WILLEY 7 presentes nas amostras que apresentaram uma maior atividade citotóxica contra a linhagem de células tumorais HCT-116 (câncer de cólon) por CG-EM.

Diversos estudos têm demonstrado o potencial anticancerígeno de macroalgas marinhas e de substâncias isoladas destes organismos (FERNÁNDEZ; HERNÁNDEZ; REGUEIRA, 2015; VILLARREAL-GÓMEZ et al., 2010). Porém, o potencial anticancerígeno de macroalgas da antártica ainda é pouco explorado. Poucas são as espécies de macroalgas antárticas que foram avaliadas pelo seu potencial anticancerígeno, entre elas se destaca a espécie *Iridaea cordata*. No nosso estudo, foram avaliados quatro extratos de *Iridaea cordata*, coletada em diferentes locais, na maior concentração (50 $\mu\text{g/mL}$). Todos os extratos apresentaram uma inibição maior a 50%, entre eles destacaram-se os extratos

obtidos a partir das macroalgas marinhas coletadas na Ilha Pinguim e em Punta Plaza, com IC₅₀ de 9,08 e 31,89 µg/mL, respectivamente.

Kim et al. (2016) isolaram e caracterizam polissacarídeos sulfatados (SPs) de *Iridaea cordata* e avaliaram sua atividade anticâncer contra células PC-3 (câncer de próstata), HeLa (câncer do colo do útero) e HT-29 (adenocarcinoma do cólon humano). Suas atividades antitumorais, embora fracas, provaram ser interessantes para atenção e aplicação médica. Martins et al. (2018) avaliaram a atividade de diferentes extratos de quatro macroalgas (*Cystosphaera jacquinotii*, *Iridaea cordata*, *Himantothallus grandifolius*, e *Pyropia endiviifolia*) coletadas em diferentes locais da Ilha Rei George contra linhas celulares de carcinoma epidermoide humano (A-431). O extrato em acetato de etila de *I. cordata* apresentou atividade (91,1 %) na concentração de 500 µg/mL e o extrato em hexano de *P. endiviifolia* na concentração de 500 µg/mL apresentou 74,9% de inibição depois de 48 horas. Pereira et al. (2015) avaliaram a atividade antitumoral de diversos extratos de macroalgas coletadas na Península Antártica. Os extratos de *Iridaea cordata*, *Desmarestia anceps* e *Pyropia endiviifolia* foram avaliados contra células do tumor maligno Glioblastoma Multiforme, um tipo de tumor cerebral maligno primário que mostra uma incidência maior em adultos.

No nosso estudo foram avaliados três extratos da espécie *Desmarestia anceps*, e um extrato de *D. antarctica*, os quais apresentaram uma inibição maior a 75% na maior concentração, sendo o extrato de *D. anceps* coletada na EACF o único que apresentou uma inibição de 50% na menor concentração, apresentando uma IC₅₀ de 14,94 µg/mL; no caso dos extratos de *D. anceps* coletada na Ilha Pinguim, e de *D. antarctica* coletada em Ipanema, estes apresentaram IC₅₀ de 15,76 e 45,35 µg/mL, respectivamente. Já no caso dos extratos de *P. endiviifolia*, coletada na Ilha Pinguim e em Punta Plaza, ambos extratos apresentaram uma inibição maior a 50% na maior concentração, mas na menor concentração a inibição foi menor a 25%.

Frassini et al. (2019) caracterizaram quimicamente extratos das macroalgas antárticas *Iridaea cordata*, *Cystosphaera jacquinotii* e *Desmarestia anceps* e avaliaram os efeitos citotóxicos contra a linhagem celular HCT-116 do câncer de cólon retal humano. Os extratos em hexano e clorofórmio de *I. cordata* e os extratos em hexano, clorofórmio e metanol de *D. anceps* foram capazes de inibir o crescimento de células cancerígenas colorretais nos três diferentes tempos de incubação (24, 48 e 72 h). A análise por CG-EM

mostrou a presença de colest-5-en-3 β -ol (epicolesterol) e ácido octadecanóico nos extratos de *I. cordata*. No espectro de *D. anceps*, foram identificados picos correspondentes a substâncias com atividade biológica descrita, como ácido hexadecanóico, fitol e fucosterol. O ácido hexadecanóico é um ácido graxo saturado com atividade anti-inflamatória, o fitol possui atividade antimicobacteriana, e o fucosterol tem atividade anti-inflamatória, antioxidante, hepatoprotetora e anticâncer (contra a linhagem celular de leucemia HL 60) (KHANAVI et al., 2012).

Pacheco et al. (2018) avaliaram o teor de ácidos graxos e a atividade anticancerígena utilizando as linhas celulares de câncer de mama humano MCF-7 e MDA-MB-231 de *Adenocystis utricularis*, *Curdiea racovitzae* e *Georgiella confluens* coletas na Península Antártica. Foram identificados 22 ácidos graxos, dos quais 9 estavam saturados, 4 eram saturados e 9 eram PUFA. Além deles, foi identificado também o fucosterol nos extratos lipídicos. Os extratos de *A. utricularis* e *G. confluens* foram os que apresentaram uma maior atividade citotóxica em 72 horas, com IC₅₀ de 59,75 e 58,78 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, nas células MDA.

No nosso estudo, o extrato de *A. utricularis* apresentou uma inibição maior a 75% na maior concentração, porém, o valor do IC₅₀ foi superior ao valor utilizado e o teste deverá ser realizado novamente. Os extratos de *C. racovitzae* apresentaram uma baixa inibição nas duas concentrações utilizadas; o extrato proveniente da amostra coletada na EACF, apresentou uma inibição maior a 50% na maior concentração, mas nenhum dos dois extratos foi selecionado para a avaliação quantitativa (cálculo do IC₅₀). O extrato de *G. confluens* coletada na Ilha Pinguim, foi um dos mais ativos na avaliação quantitativa inicial, inibindo 50% das células tumorais na concentração mais baixa, apresentando uma IC₅₀ de 38,06 $\mu\text{g/mL}$

O nosso estudo, apesar de preliminar, contribui com o conhecimento científico que o Brasil vem desenvolvendo no continente como membro do Tratado da Antártica e demonstra o potencial biotecnológico que os organismos antárticos têm. Adicionalmente, variações intraespecíficas foram observadas, tanto para os perfis químicos como para a atividade citotóxica dos extratos.

DETERMINAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DE MACROALGAS MARINHAS DA ANTÁRTICAS MEDIANTE TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Nos capítulos anteriores, nossos dados demonstraram o potencial das macroalgas antárticas como agentes antituberculose e seu potencial anticancerígeno e só foi apresentado o perfil cromatográfico das amostras mais promissoras. Considerando o formato reduzido da parte química, segue abaixo uma descrição complementar dos materiais e métodos utilizados para a determinação do perfil químico, bem como de resultados obtidos.

Para a caracterização do perfil químico das espécies de macroalgas, os extratos foram analisados utilizando Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

3.1. INTRODUÇÃO

A compreensão dos produtos naturais e sua química conduziu abordagens e análises em purificações, caracterização, determinação de estruturas, dinâmica química e metabólica, além de características que permitissem seu uso e entendimento na farmacologia. Os detalhes dos ambientes ecológicos dos recursos naturais e o impacto sobre a geração das substâncias presentes neles, suas variações e diversificação, bem como os níveis de envolvimento dos produtos na biomecânica dos processos celulares e ultracelulares, abriram o horizonte de desenvolvimento de diversas aplicações na química de espécies terrestres e organismos marinhos (KHAN, 2018).

Por milhares de anos, os produtos naturais (PNs) estiveram intimamente ligados ao uso de medicamentos tradicionais e naturais. Estudos clínicos, farmacológicos e químicos desses medicamentos tradicionais, derivados predominantemente de plantas, foram a base dos primeiros medicamentos. Um dos avanços na descoberta de medicamentos foi o uso de triagem baseada em mecanismos para o fracionamento guiado por bioensaios. A descoberta de novos medicamentos é uma busca complexa e interdisciplinar de química, farmacologia e ciências clínicas, que beneficiou imensamente a humanidade nos últimos 100 anos (BUTLER, 2004).

O uso de substâncias químicas purificadas a partir de algas marinhas vem aumentando rapidamente. Para sobreviver em um ambiente competitivo, as algas desenvolveram estratégias de defesa, entre elas, a produção de produtos naturais que resultam em um nível considerável de diversidade química-estrutural (WIENCKE; AMSLER, 2012). Produtos naturais obtidos a partir de algas marinhas, como ácidos graxos, esteroides, carotenoides, ficocoloides, lectinas, aminoácidos do tipo micosporina, substâncias halogenadas e policetídeos são considerados de alto impacto econômico e produtos de grande valor em diferentes países (COUTINHO et al., 2017). Além disso, considerando os produtos naturais, tendências recentes na descoberta de medicamentos sugerem que as algas são ótimas candidatas para fornecer novas substâncias bioativas.

Neste trabalho, na tentativa de identificar as substâncias biologicamente ativas nos extratos, o fracionamento foi realizado tomando em conta ensaios bioguiados. Com o objetivo de tentar identificar os metabólitos secundários responsáveis pela atividade antimicobacteriana dos extratos ativos, foram selecionadas duas espécies, entre todas as macroalgas coletadas e analisadas, para serem fracionadas. A primeira espécie selecionada foi *Desmarestia anceps* (IP), apesar de esta amostra não ter sido uma das mais promissórias por apresentar uma alta toxicidade, foi escolhida por ter apresentado bons resultados na avaliação da atividade antimicobacteriana contra as duas cepas usadas, na inibição da produção de NO e por ter uma maior disponibilidade de biomassa. A segunda espécie eleita foi *Curdiea racovitzae* (PP) por ter apresentado um dos maiores potenciais como agente antimicobacteriano.

3.2. MATERIAL E MÉTODOS:

Os indivíduos foram coletados em diferentes locais ao longo das Ilhas Shetland do Sul, um arquipélago localizado a aproximadamente 120 quilômetros do norte da Península Antártica. Inicialmente, foi escolhido um ponto externo à Baía, 1. a Ilha Pinguim (IP) (62°05'00"S e 57°55'00"W) e quatro pontos dentro da Baía do Almirantado na Ilha Rei George (62°02'00"S e 58°21'00"W), 2. Yellow Point (YP), 3. Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF- E), 4. Punta Plaza (PP) e 5. Ipanema (I), como pode ser observado na Figura 3.1. A Ilha Pinguim foi escolhida como ponto de referência externa à Baía do Almirantado por ter destacado entre todos os locais por apresentar uma maior riqueza de espécie.

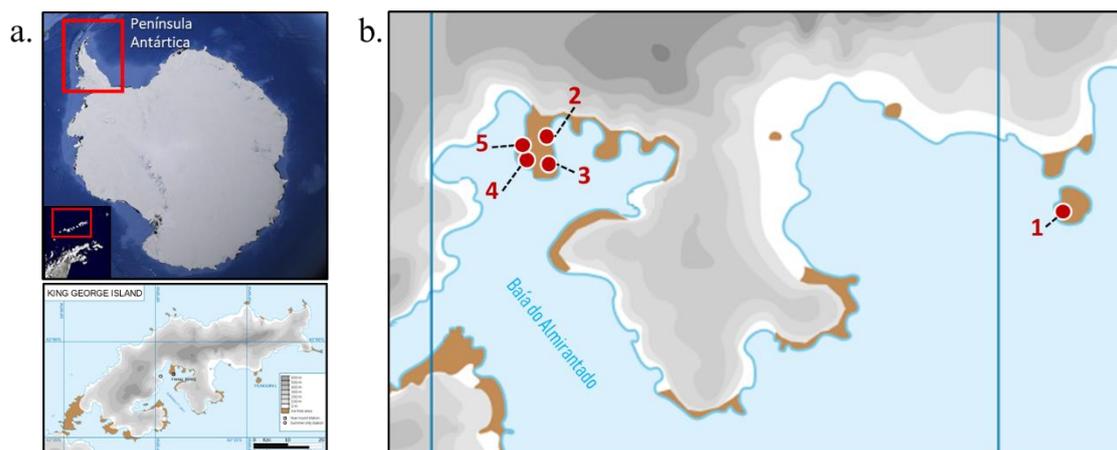


Figura 3.1. a. Mapa da localização da Península Antártica (em destaque vermelho) e da Ilha Rei George nas Ilhas Shetland do Sul na Península Antártica. b. Locais de coleta das macroalgas: 1. Ilha Pinguim (IP), 2. Yellow Point (YP), 3. Estação Antártica Comandante Ferraz (E), 4. Punta Plaza (PP), 5. Ipanema (I). Fonte: *Adaptado de Google Earth e Wikimedia Commons [Giovanni Fattori].*

As amostras de macroalgas marinhas foram coletadas durante o verão austral (nos meses de novembro e dezembro de 2017) durante a Fase 3 da Operantar XXXVI, uma expedição que fez parte do ProAntar. A primeira parte da missão foi realizada através de expedições terrestres, tendo como base a EACF e a segunda parte, realizada a bordo do navio polar “Almirante Maximiano” (H41 - Marinha do Brasil). Em cada local de amostragem, numa área de aproximadamente 80 a 100 m², todas as espécies contidas nessa área foram coletadas manualmente na região supralitoral durante a maré baixa e acondicionadas em sacos plásticos. Em laboratório, todo o material biológico foi lavado com água do mar local para remover toda a matéria estranha, identificado, acondicionado na EACF e congelado para ser transportado para o Brasil.

A identificação taxonômica foi realizada pela Dra. Maria Beatriz de Barros Barreto, professora do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), *campus* Ilha do Fundão. Os espécimes de referência de todas as espécies coletadas foram depositados no herbário do Instituto de Botânica (SP) em São Paulo, Brasil e na coleção de Botânica Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.2.1. Obtenção dos Extratos Brutos

No Brasil, no Laboratório Integrado de Química do NUPEM/UFRJ todos os organismos foram liofilizados (Liofilizador Edwards), triturados com ajuda de um liquidificador e posteriormente pesados. O material foi submetido a extração por maceração com uma

mistura de solventes orgânicos Metanol: Acetato de Etila (MeOH:AcOEt) (1:1) (Tedia, grau HLPC), a qual permitiu uma seleção de substâncias que variam de média a alta polaridade (KOTHARI; GUPTA; NARANIWAL, 2012). A extração foi repetida três vezes com intervalos de 72 horas entre elas. O volume utilizado do solvente na extração foi proporcional à biomassa na razão de 3,5 mL de solvente / 1g de material seco aproximadamente. No final de cada extração, o material foi filtrado e o solvente evaporado com auxílio de um rotaevaporador (rotaevaporador Buchi) com banho maria na temperatura controlada de 45°C. Os extratos foram pesados e armazenados a -20°C até o uso. O rendimento dos extratos brutos de cada espécie de macroalga foi expresso em porcentagem, este foi calculado a partir da relação percentual da massa seca utilizada no processo e a massa do extrato seco obtido após a extração.

3.2.2. Fracionamento dos Extratos

Entre os extratos com maior potencial antituberculose, duas amostras foram destinadas para a obtenção e identificação das substâncias ativas. O fracionamento foi guiado por bioensaios, tanto da atividade antimicobacteriana, anticancerígena, citotoxicidade e efeito imunomodulador. Os extratos das algas *Desmarestia anceps* (IP) e *Curdiea racovitzae* (PP) foram submetidos a uma partição utilizando sílica Flash F60 (*Silicycle*) em cromatografia líquida a vácuo com diferentes solventes orgânicos. Seis diferentes frações foram obtidas: hexano: acetato de etila (Hex:AcOEt) (9:1), Hex:AcOEt (7.5:2.5), Hex:AcOEt (4:6), AcOEt 100%, AcOEt: MeOH (9:1) e MeOH 100%, (Tedia, grau HLPC). Também foi avaliada atividade antimicobacteriana, o efeito imunomodulatório e a citotoxicidade das frações obtidas, utilizando os métodos descritos no primeiro capítulo.

3.2.3. Análise dos Perfis Químicos

Para a caracterização do perfil químico das espécies de macroalgas, os extratos foram analisados por diferentes técnicas cromatográficas como Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM).

3.2.3.1. Caracterização cromatográfica por Cromatografia em Camada delgada dos extratos das macroalgas antárticas

Para a identificação preliminar das classes químicas das substâncias presentes nos extratos foram realizadas análises por CCD em gel de sílica (Gel de sílica F-254

SILICYCLE®). Os extratos foram solubilizados utilizando diclorometano (CH₂Cl₂) (Tedia, grau HLPC), e as placas foram eluidas em cubas com diferentes misturas de solventes com diferentes polaridades, de forma a permitir observar substâncias de diferentes polaridades presentes na mistura. Foram utilizadas diferentes combinações de solventes (Tedia, grau HLPC): CH₂Cl₂ 100%, CH₂Cl₂:AcOEt (4:1) e CH₂Cl₂:AcOEt (1:1). Após a eluição, as placas de CCD foram inicialmente analisadas através de inspeção em câmara sob luz ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 365 nm, para poder observar a fluorescência das amostras, em seguida, as placas foram borrifadas com diferentes reagentes reveladores descritos na Tabela 3.1, e aquecidas sobre placa elétrica para favorecer as reações cromogênicas.

Tabela 3.1. Reveladores específicos utilizados na identificação de classes químicas em CCD.

Revelador	Classe Química	Resultado
Etanol 5% Ácido Sulfúrico (EtOH 5% H ₂ SO ₄)	Reagente universal para substâncias orgânicas.	Bandas de diferentes cores
Cloreto férrico (FeCl ₃)	Fenóis e ácidos hidroxâmicos.	Os ácidos hidroxâmicos ficam vermelhos, fenóis azuis ou esverdeados.
Dragendorff	Alcaloides e outras substâncias nitrogenadas.	Bandas laranjas
Permanganato de potássio (KMnO ₄)	Reagente universal para substâncias orgânicas.	Bandas amarelas
Ninhydrina	Aminoácidos, amins e amino açúcares.	Bandas roxas ou avermelhadas

Adaptado de (JORK, 1990a)

3.2.3.2. Cromatografia em Fase Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Os perfis químicos de todas as macroalgas e as frações foram obtidos através de análises por cromatografia gasosa. Uma parte do material foi separado e ressuspensionado em clorofórmio (Tedia, grau HLPC), posteriormente foi mantido em aparelho sonificador por 5 minutos e depois filtrado utilizando-se filtros de PTFE (Politetrafluoretileno, 45 µm, Millipore). Antes de cada injeção, o material filtrado foi ressuspensionado em acetato de etila (Tedia, grau HLPC), de forma a obter uma concentração final de 1 mg/mL.

O método utilizado foi desenvolvido para a análise destas amostras. As análises foram realizadas em equipamento Shimadzu CG-2010 acoplado ao espectrômetro de massas QP-2010 ultra, composto por autoinjeter AOC-20i e uma coluna capilar de sílica fundida RTx-1MS (L = 30m x $d_{int} = 0,25$ nm) da Restek Corporation (EUA). Temperatura do injetor: 280 °C (SPLIT). Condições do detector de massas: Fonte de ionização, 200°C; Interface, 305°C. A temperatura da coluna foi mantida a 120°C durante 2 minutos, seguido de rampa de temperatura até 305°C (taxa de 6) e mantida a esta temperatura durante 3 minutos, totalizando 36 minutos de análise. O gás hélio (He) foi utilizado como gás de arraste.

3.2.4. Análises dos Dados Obtidos

Para avaliar as semelhanças e diferenças entre os perfis cromatográficos obtidos por CG-EM foram aplicadas ferramentas quimiométricas exploratórias. Inicialmente o software COWtool foi utilizado para o alinhamento de base de cada cromatograma e para corrigir o desvio de tempo de retenção dos picos através do Correlation Warping Algorithm (COW), utilizando-se o método de Nielsen et al. (1998) com ajuda dos programas R e C Tool (NIELSEN; CARSTENSEN; SMEDSGAARD, 1998). Para a execução do COW foi utilizado o cromatograma do extrato de *Iridaea cordata* coletada na Ilha Pinguim por apresentar um o maior número de picos.

Uma matriz de dados composta dos dados alinhados de cada cromatograma, totalizando 29 linhas (amostras) e 3480 variáveis (tempos de leitura) foi submetida à Análise de Componentes Principais (PCA – do inglês Principal Component Analysis) utilizando os dados normalizados. A correlação dos perfis químicos sumarizada foi feita em linguagem R (www.rproject.org) usando o pacote "ChemometricsWithR" (WEHRENS, 2011).

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante anos, a biota da Antártica atraiu a atenção dos biólogos. A flora das macroalgas não é muito diversificada quando comparada às regiões mais quentes. Entretanto, ela é caracterizada por um alto grau de endemismo, onde de 35 a 40% das espécies identificadas são endêmicas. Apesar disso, a biomassa de algas marinhas é alta. Esta é uma boa indicação do seu papel ecológico, visto que as macroalgas marinhas são importantes produtores primários em áreas submarinas rasas servindo como fonte de alimento e abrigo para um grande número de animais (OLIVEIRA et al., 2009). Cerca de

130 espécies de macroalgas marinhas foram documentadas, sendo a região da Península Antártica a que apresenta uma riqueza de espécies mais alta (PELLIZZARI et al., 2017; WIENCKE; AMSLER, 2012).

No nosso estudo foram avaliadas 29 amostras de macroalgas marinhas coletadas em cinco locais diferentes da Península Antártica, das quais, 17 (58,6%) foram coletadas dentro da Baía do Almirantado: Estação Antártica Comandante Ferraz (EACF) (5 amostras), Punta Plaza (7 amostras), Ipanema (4 amostras) e Yellow Point (1 amostra); e como ponto de referência exterior à Baía do Almirantado foram coletadas 12 amostras (41,4%) na Ilha Pinguim. No total, foram descritas 14 espécies de macroalgas, alguns delas representadas na Figura 3.2; todas as macroalgas foram identificadas até o nível de espécie.

As macroalgas vermelhas são relatadas como as mais comuns na Península Antártica em diversos estudos, embora raramente dominem em termos de biomassa ou cobertura, em qualquer profundidade (WIENCKE, 2011). A exceção mais comum a isso é *Palmaria decipiens*, que pode ser uma espécie dominante ou co-dominante em águas rasas, particularmente em áreas relativamente protegidas com topografia levemente inclinada (WIENCKE; AMSLER; CLAYTON, 2014).

Oliveira et al. (2009) relataram um levantamento taxonômico das algas coletadas durante a 25ª Expedição Antártica Brasileira na Baía do Almirantado, nas Ilhas Shetland do Sul, onde quarenta e duas espécies foram coletadas e identificadas 21 Rhodophyta (algas vermelhas), 14 Phaeophyceae (algas pardas) e 7 Chlorophyta (algas verdes). Em ordem de abundância, foram registradas as espécies *Desmarestia antarctica*, *Iridaea cordata*, *Protomonostroma undulatum*, *Plocamium cartilagineum* e *Desmarestia anceps* como as mais frequentes e, a espécie *Palmaria decipiens*, a que apresentou maior biomassa na região.

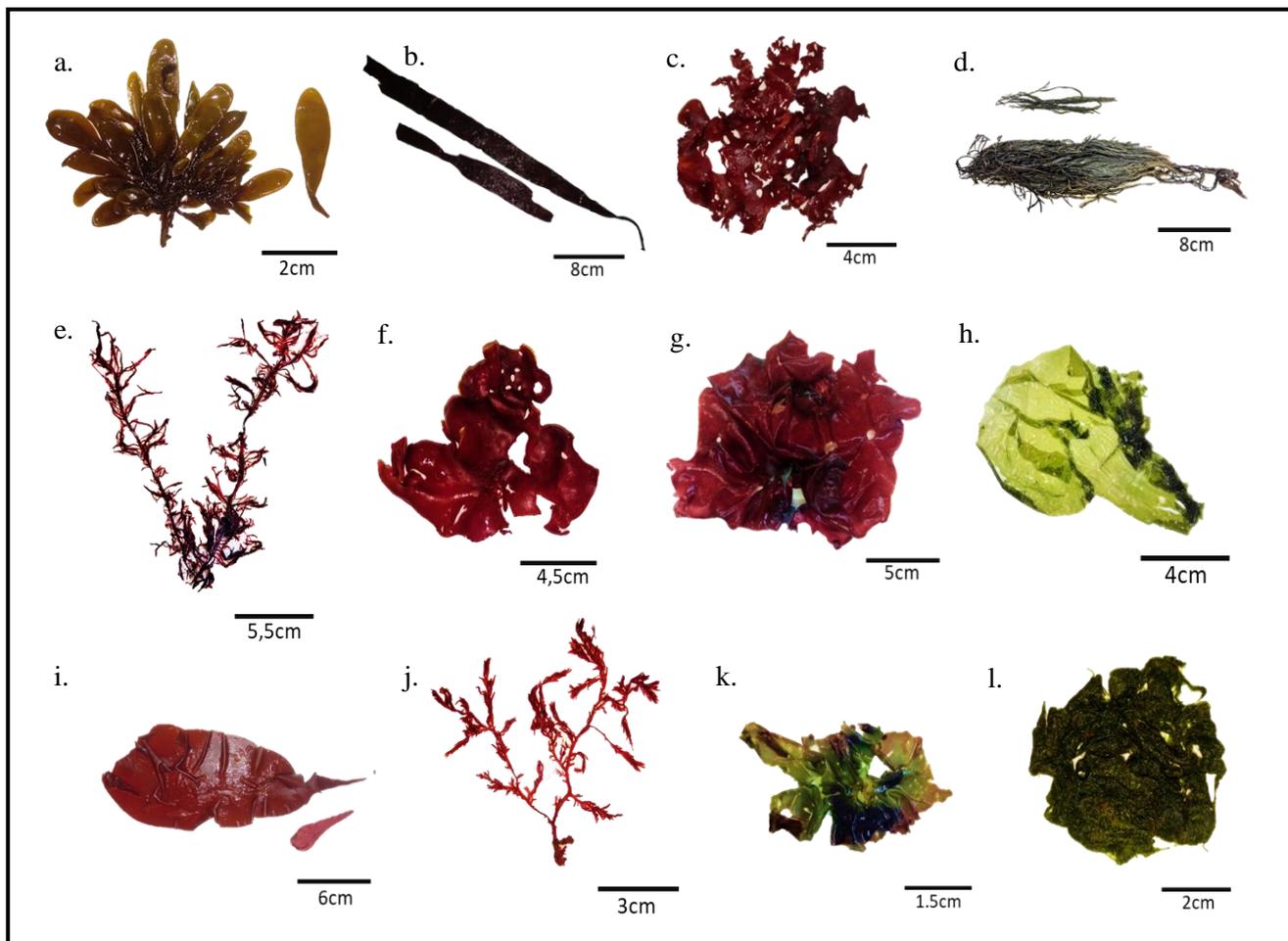


Figura 3.2. Espécies de macroalgas coletadas: a. *Adenocystis utricularis*, b. *Ascoseira mirabilis*, c. *Curdiea racovitzae*, d. *Desmarestia anceps*, e. *Georgiella confluens*, f. *Gigartina skottsbergii*, g. *Iridaea cordata*, h. *Monostroma harioti*, i. *Palmaria decipiens*, j. *Plocamium cartilagineum*, k. *Pyropia endiviifolia*, l. *Spongomorpha arcta*.

Pellizari et al. (2017), caracterizaram a distribuição espacial da diversidade de oito ilhas pertencentes às Ilhas Shetland do Sul (Ilha Pinguim, Deception, Livingston, Halfmoon, Robert, Nelson, King George, e Elefante). Um total de 104 espécies de algas marinhas bentônicas foram identificadas (28 Phaeophyceae, 24 Chlorophyta e 52 Rhodophyta). Em geral, a composição eminente na zona entremarés foi dominada por *Pyropia endiviifolia*, *Ulva hookeriana*, *U. intestinalis*, *Monostroma harioti* e *Adenocystis utricularis*. As poças de maré foram dominadas por *Iridaea cordata* e *Palmaria decipiens*; e a zona supralitoral foi dominada por densos trechos de *Desmarestia anceps* e *D. menziesii*, *Himantothallus grandifolius* e Gigartinales.

No nosso estudo, os filos mais abundantes coletados foram as Rhodophyta (70%), seguidas das Ochrophyta (22%) e as Chlorophyta (8%), o que coincide em ordem de abundância com estudos descritos anteriormente (CARROLL et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2009; PELLIZZARI et al., 2017). Variações espaciais na diversidade de espécies

foram observadas entre os locais de coleta, e a Ilha Pinguim e Punta Plaza foram os locais que apresentaram a maior diversidade entre as regiões estudadas. No entanto, mudanças na distribuição biogeográfica ou introdução de alguns táxons, resultantes de atividades antropogênicas e/ou mudanças climáticas, podem causar a variação entre os diversos estudos taxonômicos realizados na Península Antártica (PELLIZZARI et al., 2017)..

De uma forma geral, os rendimentos variaram de 0,34 a 16,85% (Tabela 3.2). As espécies que apresentaram um maior rendimento foram *Monostroma hariotii* (IP) com 16,30%, *Myriogramme mangini* (PP) com 15,50% e *Plocamium cartilagineum* (IP) com 11,43%. No entanto, algumas amostras não atingiram 1% de rendimento, como no caso de *Iridaea cordata* (IP) com 0,34%, *Gigartina skottsbergii* (IP) com 0,55%, *I. cordata*. (EACF) com 0,83% e *G. skottsbergii* (PP) com 0,68%. Os rendimentos das amostras podem variar de acordo ao método de extração, às espécies de algas estudadas, assim como também podem atribuir-se a fatores ambientais. No entanto, como todas as amostras foram extraídas nas mesmas condições, a variação no desempenho não se deve ao método de extração. A variação entre as espécies coletadas nos diferentes locais pode se dever a diminuição da produção de substâncias lipofílicas, assim como à diferença na concentração de polissacarídeos das espécies estudadas. Como pode-se observar na Tabela 3.2, variações geográficas entre espécies podem influenciar na produção de substâncias lipofílicas, como no caso da espécie *Iridaea cordata*, a qual apresentou um rendimento de 0,34% quando coletada na Ilha Pinguim, 1,48% em Ipanema e 5,39% em Punta Plaza. O mesmo aconteceu com outras espécies como *Palmaria decipiens*, que ao ser coletada na Ilha Pinguim teve um rendimento de 11,28% e a população coletada em Yellow Point, teve um rendimento reduzido para 6,97%.

Tabela 3.2. Informações sobre os rendimentos dos extratos brutos das macroalgas marinhas coletadas na Península Antártica.

Amostra	Local de coleta	Amostras secas (g)	EBtotal (g)	Rendimento (%)
Chlorophyta				
<i>Monostroma hariotii</i>	Ilha Pinguim	0,92	0,15	16,30
<i>Spongomorpha arcta</i>	Ilha Pinguim	16,86	0,73	4,33
Ochrophyta				
<i>Adenocystis utricularis</i>	Ilha Pinguim ^a	1,91	0,06	3,14
	Ilha Pinguim ^b	8,72	0,24	2,77
	Punta Plaza	11,70	0,46	3,93

<i>Ascoseira mirabilis</i>	Ilha Pinguim	19,39	1,22	6,29
	EACF	203,47	5,54	2,72
<i>Desmarestia anceps</i>	Ilha Pinguim	53,84	2,05	3,81
	Ipanema	9,67	0,13	1,34
<i>Desmarestia antarctica</i>	Ipanema	4,86	0,14	2,88
Rhodophyta				
<i>Curdiea racovitzae</i>	EACF	54,01	1,19	2,20
	Punta Plaza	78,62	1,35	1,72
<i>Georgiella confluens</i>	Ilha Pinguim	6,67	0,20	3,00
<i>Gigartina skottsbergii</i>	EACF	56,97	1,13	1,98
	Ilha Pinguim	32,45	0,18	0,55
	Punta Plaza	65,75	0,45	0,68
<i>Iridaea cordata</i>	EACF	29,04	0,24	0,83
	Ilha Pinguim	70,74	0,24	0,34
	Punta Plaza	26,41	1,42	5,38
	Ipanema	9,55	0,14	1,47
<i>Myriogramme mangini</i>	Punta Plaza	8,58	1,33	15,50
<i>Palmaria decipiens</i>	Ilha Pinguim	17,05	1,00	5,87
	Ipanema	3,09	0,12	3,88
	Yellow Point	14,05	0,98	6,98
<i>Plocamium cartilagineum</i>	EACF	2,91	0,18	6,19
	Ilha Pinguim	1,05	0,12	11,43
	Punta Plaza	7,90	0,09	1,14
<i>Pyropia endiviifolia</i>	Ilha Pinguim	11,88	0,21	1,77
	Punta Plaza	20,94	0,21	1,00

^a fase jovem ^b fase adulta

Em relação aos estudos químicos, os perfis cromatográficos dos extratos foram, inicialmente, observados através da cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando três sistemas diferentes de fases móveis (FM) que permitiram observar as diferentes substâncias presentes. O uso de FM com diferentes polaridades e o uso da solução de 5% de H₂SO₄ em EtOH, um revelador universal, permitiu fazer um *screening* inicial das diferentes substâncias presentes nos extratos. Na Figura 3.3 são apresentados os resultados de dois dos sistemas de fase móvel utilizados.

A CCD das amostras além de permitir observar a separação das substâncias presentes nos extratos brutos, também permitiu observar a que existe uma variação nestes metabolitos de que pode ser influenciada por fatores geográficos como, por exemplo, a espécie *Palmaria decipiens*; a amostra coletada em Ipanema apresentou uma maior diversidade

química quando utilizada uma FM mais apolar. Quando utilizada uma FM mais polar, observou-se uma grande similaridade entre as amostras coletadas na Ilha Pinguim, Ipanema e Yellow Point.

Esta variabilidade química também foi observada em outras amostras; no caso da *Adenocystis utricularis*, que quando foi coletada em Punta Plaza apresentou uma maior abundância de substâncias que quando coletada na Ilha Pinguim. No caso da espécie *Iridaea cordata*, que foi coletada em quatro locais diferentes (Ilha Pinguim, EACF, Punta Plaza e Ipanema), a amostra que apresentou uma maior abundância de substâncias, foi a coletada em Punta Plaza. Entre todas as amostras, os extratos coletados na EACF, junto com os extratos de *Desmarestia anceps* (IP), *Pyropia endiviifolia* (IP), *Curdiea racovitzae* (PP) e *Palmaria decipiens* (I) foram os que apresentaram uma maior diversidade química nas condições utilizadas, ao contrário dos extratos de *Adenocystis utricularis* (IP), *Monostroma hariotii* (IP) ou *Plocamium cartilagineum* (IP-PP), os quais apresentaram uma baixa diversidade química. Por outro lado, pode se observar que algumas algas apresentaram substâncias em comum, como no caso do *spot* vermelho que apresenta um fator de retenção (Rf) igual a 0,81 ou o *spot* verde com Rf igual a 0,38 presente em diversas amostras (Figura 3.3 b).

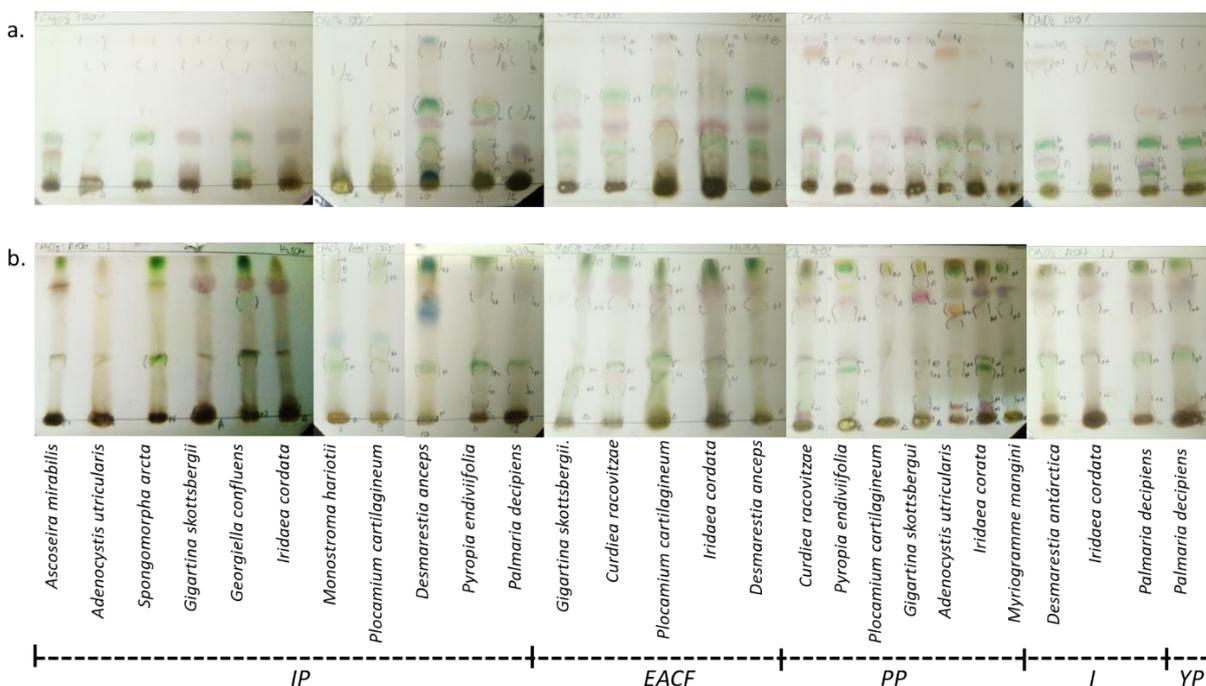


Figura 3.3. Cromatografia em camada delgada das amostras coletadas na Península Antártica. FM: a. CH_2Cl_2 100%, b. CH_2Cl_2 :AcOEt:1:1. Revelador: 5% H_2SO_4 em EtOH. IP: Ilha Pinguim; EACF: Estação Antartica Comandant Ferraz; PP: Punta Plaza; I: Ipanema; YP: Yellow Point.

Da mesma forma se realizou um *screening* do perfil químico mediante CCD utilizando-se reagentes específicos para a identificação de algumas classes químicas de metabólitos secundários. Todos os extratos foram analisados nas mesmas condições cromatográficas para facilitar a comparação entre eles (Figura 3.4).

Primeiramente as amostras foram analisadas sob luz UV de longo comprimento de onda 365 nm. A luz UV de ondas longas é usada para identificar substâncias com fluorescência (TOUCHSTONE, 1992). As zonas cromatográficas fluorescentes características e específicas de cada substância podem produzir manchas fluorescentes em amarelo, verde, vermelho ou azul (JORK, 1990b). Por exemplo, quando um cromatograma desenvolvido e visualizado sob luz UV de ondas longas, as substâncias com grupos amina primária serão detectados como manchas esverdeadas fluorescentes brilhantes (FRIED; SHERMA, 1999), alguns alcaloides podem apresentar intensa fluorescência azul ou amarela; dependendo da estrutura, flavonoides podem apresentar fluorescência amarela, laranja, azul ou verde, extratos que contêm ácidos fenólicos ou cumarinas, também podem mostrar áreas fluorescentes azuis (MANDAL et al., 2015), bandas azuladas e laranjas podem sugerir a presença de terpenos e esteróis (DE ARRUDA, 2015), bandas alaranjadas ou avermelhadas podem sugerir a presença de pigmentos vegetais como clorofila (DE SOUZA NETO, 2016).

Todas as amostras apresentaram zonas cromatográficas fluorescentes sem a necessidade de um agente cromogênico adicional; na sua maioria foram observadas bandas de fluorescência laranja por toda a extensão da placa que poderiam indicar a presença de terpenos, esteróis (DE ARRUDA, 2015) ou pigmentos vegetais (DE SOUZA NETO, 2016), também foi possível observar manchas de fluorescências azul e verde, que podem indicar a presença de ácidos fenólicos (MANDAL et al., 2015). O permanganato de potássio (KMnO_4), pode ser considerado também um revelador universal; este reagente oxida a maioria das substâncias orgânicas; qualquer substância que contenha grupamentos funcionais oxidáveis, como álcool, éter, éster, alceno, alquino, alquil aromático, cetona, ácido carboxílico, amina, amida, aparecerão como manchas marrom-amareladas (REACH DEVICES, 2017). Para substâncias altamente insaturadas, como os polietilenos, a oxidação parece ser muito rápida, em contraste com as substâncias saturadas (WAKSMUNDZKA-HAJNOS; SHERMA, 2010).

O uso de ambos, tanto o 5% de H_2SO_4 em EtOH como o KMnO_4 , nos permitiu observar a diversidade química das amostras, além de poder comparar a diversidade e abundância

de substâncias entre as diversas espécies estudadas e se estas substâncias variaram de acordo ao local onde foram coletados. As amostras que apresentaram uma menor abundância de substâncias, nestas condições, foram as amostras coletadas na Ilha Pinguim, em especial as espécies *Monostroma hariotii*, *Adenocystis utricularis* e *Plocamium cartilagineum*. Estas duas últimas espécies apresentaram uma maior abundância de substâncias quando foram coletadas em Punta Plaza.

A possibilidade de usar reagentes específicos é uma das vantagens essenciais da cromatografia em camada delgada (SIQUEIRA et al., 2003). Os reagentes seletivos simplificam as demandas na separação da CCD porque as zonas sobrepostas não são um problema se apenas o analito for detectado (FRIED; SHERMA, 1999).

A ninhidrina, por exemplo, é o reagente mais comumente utilizado para a detecção de aminoácidos, mas também produz bandas coloridas com outras substâncias redutoras, como o ácido ascórbico (FRIED; SHERMA, 1999). Na análise de biomoléculas como aminoácidos, os cromatogramas desenvolvidos são secos e as placas resfriadas, são tratadas com o reagente ninhidrina. O aquecimento a 90-100°C produz zonas azuis a roxas para todos os aminoácidos, exceto a prolina, o que dá uma mancha amarela (SRIVASTAVA, 2010). Já a histidina e o triptofano desenvolvem uma reação muito fraca com a ninhidrina. Os aminoácidos reagem com a ninhidrina formando o "Azul de Ruehmann", esta reação se realiza em duas fases. Na primeira, a ninhidrina reage com molécula de aminoácido formando ninhidrina reduzida, CO₂, aldeído do aminoácido e NH₃. Na segunda fase, uma molécula de ninhidrina, mais uma molécula de ninhidrina reduzida reage em NH₃, formando Azul de Ruehmann, por perda de três moléculas de água (SIQUEIRA et al., 2003). A maioria das amostras deste trabalho deu resultado positivo quando utilizado este reagente, indicando a presença de aminoácidos nas amostras, com exceção das espécies *Adenocystis utricularis* (IP-PP) e *Spongomorpha arcta* (IP), as quais apresentaram bandas muito fracas ou não apresentaram bandas positivas a esta reação. As amostras variaram na intensidade das bandas de cor roxo, sendo as espécies *Gigartina skottsbergii* (EACF), *Curdiea racovitzae* (EACF), *Iridaea cordata* (PP) e *Desmarestia antarctica* (I) as que apresentaram uma coloração mais forte. As espécies *Desmarestia anceps* (IP), *Plocamium cartilagineum* (EACF) e *Iridaea cordata* (PP) apresentaram bandas de color amarelo mais intenso, podendo indicar a presença do aminoácido prolina.

O reagente cloreto férrico, é um reagente específico utilizado para a detecção de taninos e substâncias fenólicas, dando como resultado positivo a presença de manchas verde escuras (MANDAL et al., 2015). Aminas e aromáticos, também podem aparecer como manchas azuis e ácidos hidroxâmicos como manchas vermelhas (FRIED; SHERMA, 1999). Hasegawa e Fishing (1991) compararam o uso de solução aquosa e uma solução etanólica de cloreto férrico para a detecção de fenóis. Quando usaram a solução etanólica, os fenóis apareciam como manchas de cor cinza claro, cinza médio ou marrom, com pouca nitidez, mostrando um comportamento de coloração claramente diferente ao da solução aquosa, com a qual os fenóis apresentavam uma notável coloração púrpura ou verde azulada.

No caso do reagente utilizado neste estudo foi preparado em solução etanólica, dando como resultados a presença de manchas verde escuras. Mais da metade dos extratos analisados deu positivo quando utilizamos este reagente, e as manchas variaram na intensidade de cor. A maioria dos extratos apresentou manchas de cor verde escuro, indicando a presença de substâncias fenólicas. Algumas amostras também apresentaram bandas de cor azul que podem indicar a presença de ácidos hidroxâmicos.

Os alcaloides, com algumas exceções, são substâncias heterocíclicas que contêm átomos de nitrogênio terciários ou quaternários. Alguns íons de metais pesados, podem precipitar estes alcaloides, podendo ser usados como reagentes de visualização para a detecção destas substâncias. Os reagentes de visualização comumente usados para alcaloides são variedades diferentes do reagente Dragendorff (TREIBER, 1986). Algumas outras substâncias também podem reagir com o reagente Dragendorff como algumas pironas, chalconas e proteínas (SVENDSEN; VERPOORTE, 2011). Nenhuma das amostras deu resultado positivo para alcaloides, já que não apresentaram bandas de cor laranja intensa. A única amostra que apresentou uma coloração laranja, foi a amostra de *Desmarestia anceps* (IP), mas a coloração foi muito fraca.

A interpretação da CCD permitiu observar diferenças qualitativas e quantitativas dos metabólitos nos extratos brutos. As amostras apresentaram perfis diversos e complexos, podendo evidenciar uma maior complexidade química e maior abundância de substâncias em alguns extratos.

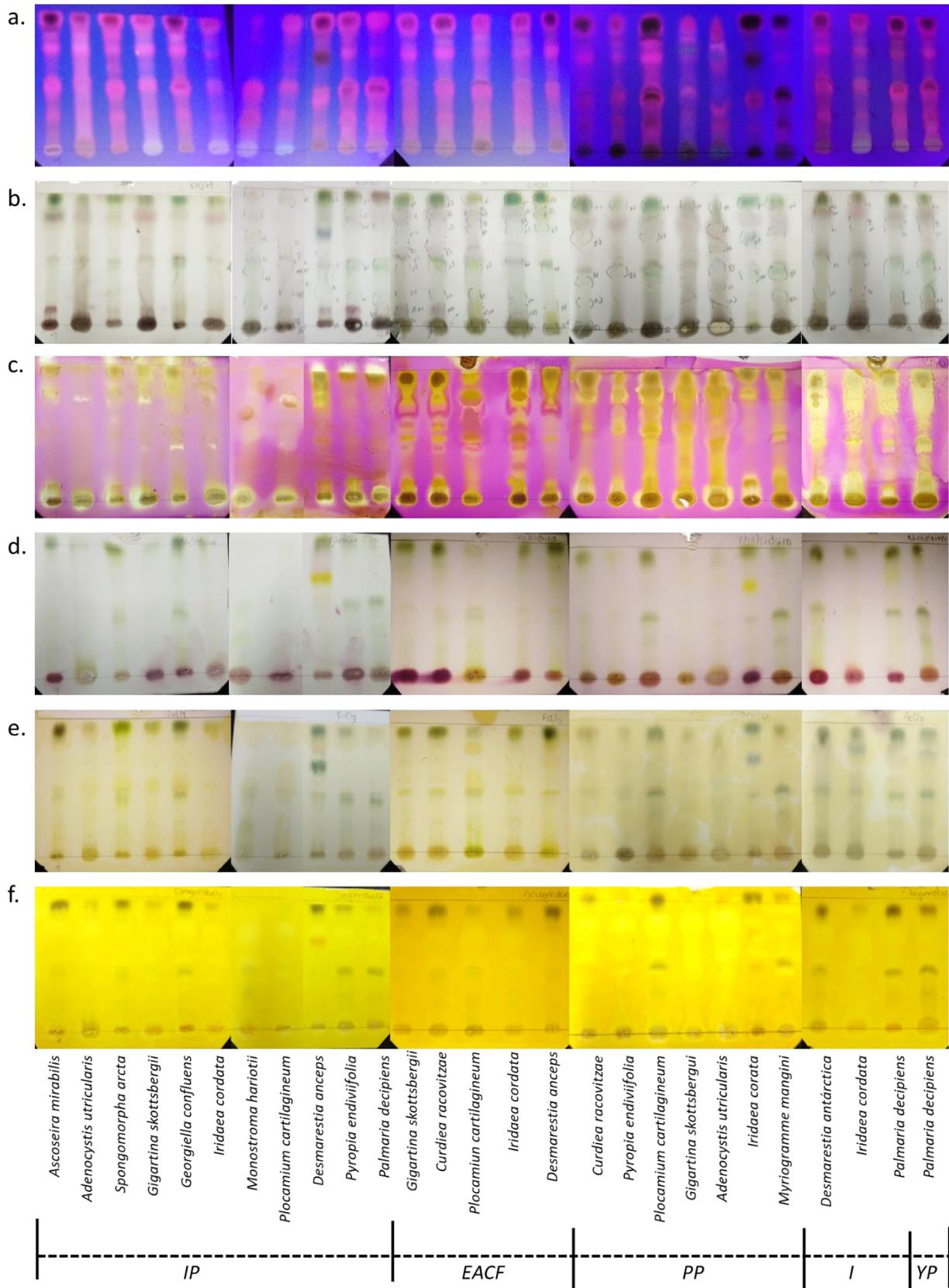


Figura 3.4. CCD das macroalgas marinhas coletadas na Península Antártica. FM: CH₂Cl₂:AcOEt:4:6. Reveladores: a. UV 365nm, b. 5% H₂SO₄ em EtOH, c. KMnO₄, d. Ninhidrina, e. FeCl₃, f. Dragendorff. IP: Ilha Pinguim; EACF: Estação Antártica Comandante Ferraz; PP: Punta Plaza; I: Ipanema; YP: Yellow Point.

A rápida detecção de produtos naturais biologicamente ativos tem um papel estratégico na pesquisa química de extratos brutos. Técnicas como CG acopladas a EM como CG-EM, proporcionam informações sobre a estrutura dos metabolitos antes de realizar o isolamento (WAKSMUNDZKA-HAJNOS et al., 2008). Estas técnicas permitem uma determinação rápida dos componentes conhecidos utilizando uma pequena quantidade de amostra, baseando-se na coincidência dos parâmetros tanto cromatográficos (ex. tempo de retenção) como espectroscópicos (espectros de massa, padrões de fragmentação característico), para substâncias testadas, com taxas de retenção e espectros de massa de bancos de dados (bibliotecas de espectro, NIST 05 e WILEY 7); a coincidência destes parâmetros leva ao possível reconhecimento da estrutura de uma substância em uma mistura e a sua possível identificação (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2009).

Com a finalidade de sugerir as substâncias possivelmente responsáveis pelas atividades encontradas, todos os extratos foram analisados por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). Devido ao grande número de dados (amostras - tempo de retenção nos perfis químicos) obtidos mediante CG-EM e a sua alta complexidade, a aplicação de técnicas quimiométricas auxiliou na visualização de padrões de correlação entre as amostras e a interpretação dos dados. Neste contexto, foi utilizado a Análise de Componentes Principais (ACP) mediante a construção de uma matriz que incluía como variável independente cada amostra estudada e como variável dependente o tempo de retenção nos perfis químicos dos cromatogramas obtidos. Através da ACP pode-se reduzir a dimensão do conjunto de dados, encontrando combinações lineares das principais variáveis que explicam a maior parte da variabilidade dos dados (WOLD; ESBENSEN; GELADI, 1987).

A ACP permitiu avaliar o grau de correlação dos perfis químicos das amostras, bem como encontrar as substâncias que mais contribuíram para os agrupamentos. O componente principal 1 (CP1) e o CP2 explicaram juntas 39,6% da variabilidade dos dados cromatográficos. Por meio do gráfico dos escores (Figura 3.5) foi possível discriminar, pelos tempos de retenção dos perfis químicos, alguns grupamentos de acordo à espécie coletada.

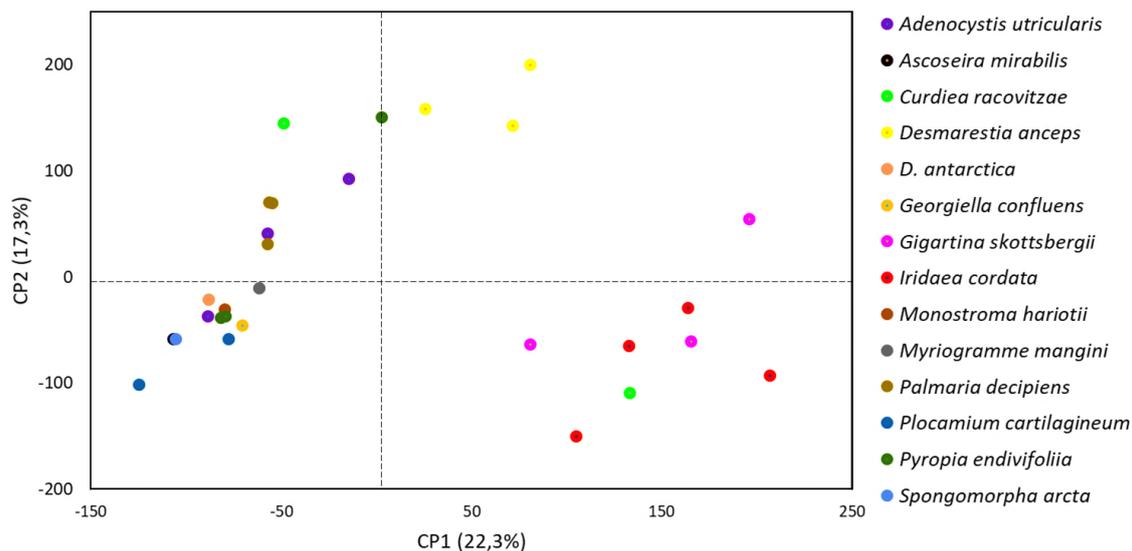


Figura 3.5. Gráfico dos escores dos Componentes Principais 1 e 2 (CP1 e CP2) na Análise dos Componentes Principais dos perfis químicos obtidos por CG-EM. Círculos de diferentes cores representam cada espécie de amostra avaliada neste estudo.

Estes agrupamentos podem ser observados em algumas espécies como no caso de *Iridaea cordata* (círculos vermelhos), *Gigartina skottsbergii* (círculos rosas), *Desmarestia anceps* (círculos amarelos), *Adenocystis utricularis* (círculos roxos). No caso de algumas outras espécies nenhum dos dois primeiros componentes agruparam as amostras coletados em diferentes locais, como no caso das espécies *Curdiea racovitzae* e *Pyropia endivifolia*.

O gráfico da Figura 3.6, que ordena o peso (*loadings*) do pico dos cromatogramas na variação de cada componente da APC pelo tempo de retenção, evidencia quais são as substâncias mais relevantes para a distribuição das amostras no espaço fatorial dado pelo gráfico dos escores. Neste sentido os metabólitos que eluíram no tempo de retenção em 12,4 e 26,3 minutos foram às substâncias mais importantes na separação das espécies avaliadas.

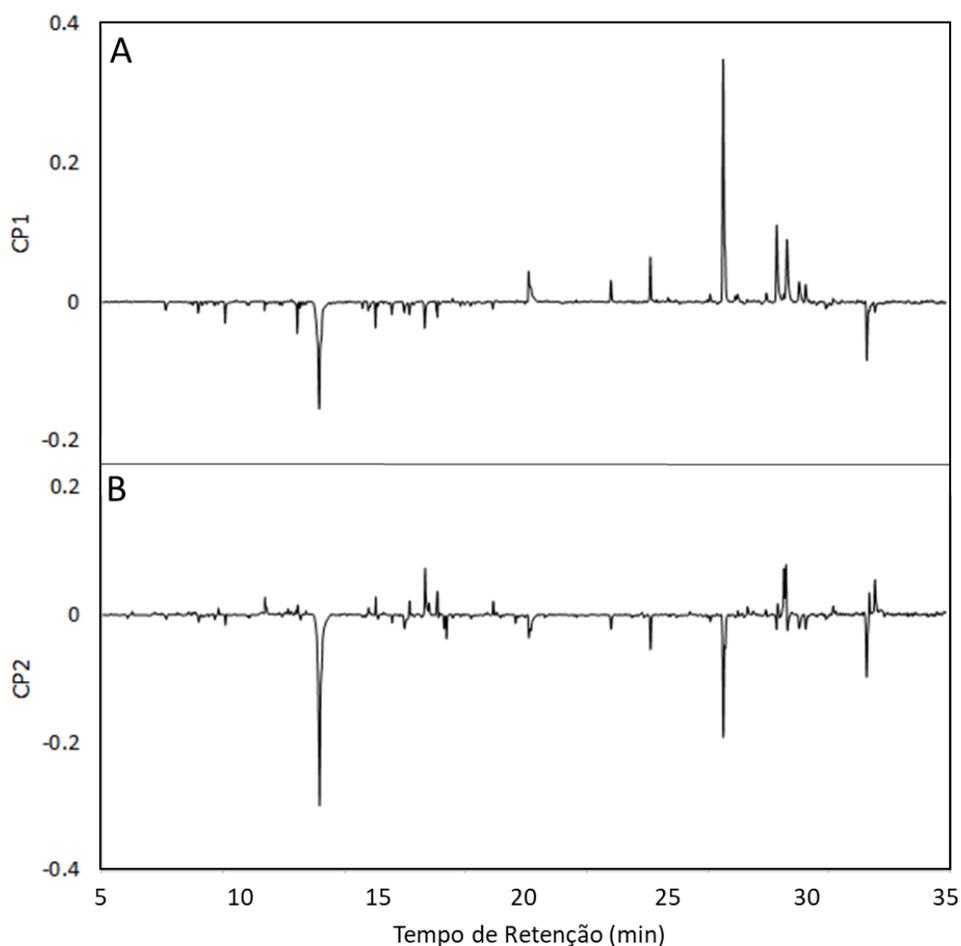


Figura 3.6. (A) Peso do sinal do cromatograma na variação de CP1 pelo tempo de retenção. (B) Peso do sinal do cromatograma na variação de CP2 pelo tempo de retenção.

Mediante as análises realizadas em CG-EM foi possível obter os espectros para as substâncias sugeridas pelas bibliotecas NIST 05 e WILLEY 7. As substâncias referentes aos picos descritos sugerida pelo CG-EM foram o ácido ascórbico com tempo de retenção em 12,4 minutos e o 3β colest-5-en-3-ol em 26,3 minutos (Figura 3.7).

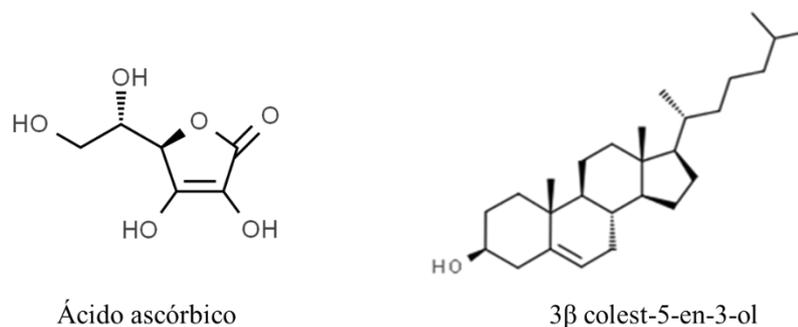


Figura 3.7. Substâncias sugeridas mais importantes na separação das espécies avaliadas.

O método de análises de dados permitiu observar os agrupamentos das diferentes espécies em função as substâncias presentes nos extratos analisados. O fato de que os extratos da uma mesma espécie, não tenham uma similaridade do 100%, se deve a diversos fatores, tanto dos indivíduos coletados como dos diversos fatores ambientais no momento da coleta.

Os perfis cromatográficos de algumas amostras são descritos a continuação para poder observar a diversidade de metabolitos presentes nos extratos:

Na análise do cromatograma do extrato bruto da macroalga *Iridaea cordata* (IP), foram integrados e numerados catorze picos majoritários (Figura 3.8), cada pico foi descrito com base na sugestão do banco de dados da biblioteca NIST 05 (software do CG-EM) (Tabela 3.3). Devido à grande diversidade das amostras e à diferença tanto na abundância quanto na quantidade de substâncias presentes nas amostras, os picos com a maior área foram selecionados como os picos majoritários em cada amostra. Os picos 2, 4, 5, 9 e 14 foram os que apresentaram uma maior abundância. Entre as substâncias majoritárias sugeridas pelo banco de dados, foram identificados um ácido graxo (pico 3), derivados de ácidos graxos e dois esteroides (picos 8 e 9). Esta amostra foi a que apresentou uma maior abundância de substâncias.

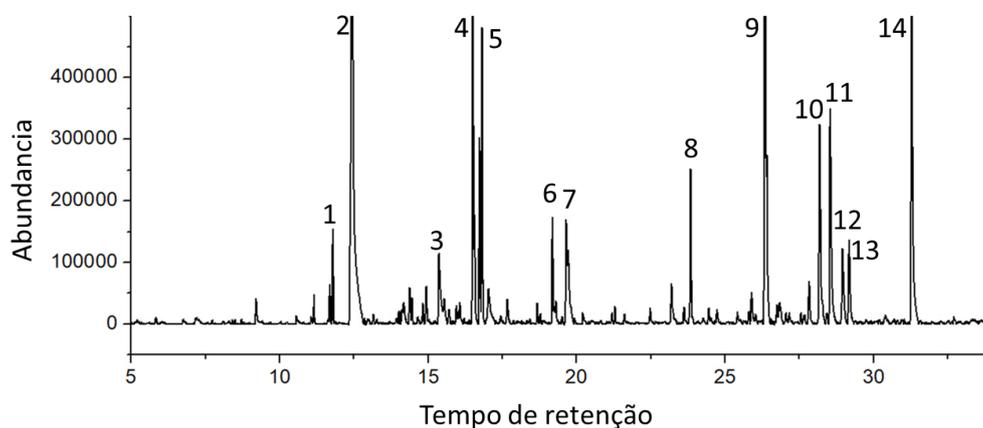


Figura 3.8. Cromatograma obtido do extrato da macroalga *Iridaea cordata* coletada na Ilha Pinguim, por CG-EM.

Tabela 3.3. Substâncias majoritárias detectadas no extrato da macroalga *Iridaea cordata* coletada na Ilha Pinguim, por CG-EM

Pico	Tempo de retenção	Área (%)	Similaridade (%)	Substância sugerida	Fórmula molecular
1	11,792	1,95	94	Éster metílico de ácido hexadecanóico,	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
2	12,451	25,13	91	2,6-dihexadecanoato de ácido ascórbico	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
3	15,373	1,90	87	Ácido octadecanóico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
4	16,511	12,57	89	Laurato isoamílico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
5	16,82	6,57	84	2,3-bis(acetyloxy) propil ester de ácido hexadecanoico	C ₂₃ H ₄₂ O ₆
6	19.194	2,07	86	Laurato de isoamilo	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
7	19.653	3,00	87	Éster 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etílico do ácido hexadecanóico	C ₁₉ H ₃₈ O ₄
8	23,84	3,45	88	3β colest-4,6-dien-3-ol	C ₂₇ H ₄₄ O
9	26,347	16,00	94	3β colest-5-en-3-ol	C ₂₇ H ₄₆ O
10	28,185	5,84	78	Não identificada	-----
11	28,542	7,26	71	Não identificada	-----
12	28,950	2,52	74	Não identificada	-----
13	29,180	2,25	79	Não identificada	-----
14	31,283	11,43	35	Não identificada	-----

Na análise do cromatograma do extrato bruto da macroalga *Desmarestia antarctica* (I), foram integrados sete picos majoritários (Figura 3.9), cada pico foi descrito com base na sugestão do banco de dados da biblioteca NIST (software do CG-EM) (Tabela 3.4). O extrato de *D. antarctica* apresentou três picos com maior abundância, os picos 2, 4 e 7, com 93, 92 e 47% de similaridade respectivamente. Os picos 1 e 7 apresentaram uma baixa similaridade. Entre as substâncias majoritárias foram identificados dos ácidos graxos saturados (picos 2 e 3).

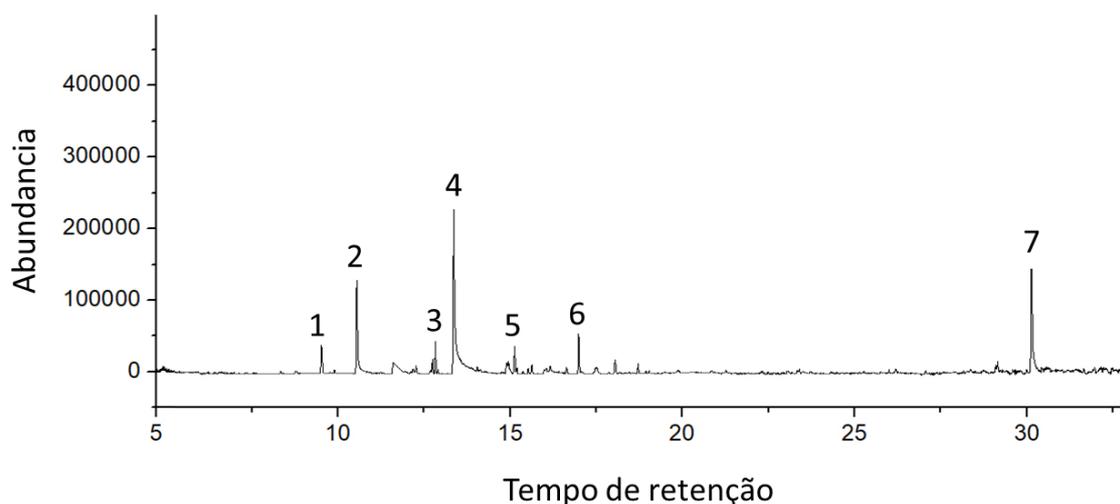


Figura 3.9. Cromatograma obtido do extrato da macroalga *Desmarestia antarctica* coletada em Ipanema, por CG-EM.

Tabela 3.4. Substâncias majoritárias detectadas no extrato da macroalga *Desmarestia antarctica* coletada em Ipanema, por CG-EM

Pico	Tempo de retenção	Área (%)	Similaridade (%)	Substância sugerida	Fórmula molecular
1	8,067	5.25	66	Não identificada	----
2	9,225	16.16	93	Ácido tetradecanoico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
3	11,796	4.56	87	Metil isoheptadecanoato	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
4	12,401	39.26	92	2,6-dihexadecanoato de L-(+)-ácido ascórbico	C ₃₈ H ₆₈ O ₈
5	14,386	5.62	82	2,4,4-trimetilciclopentanol,	C ₈ H ₁₆ O
6	16,485	5.47	87	Tributil acetilcitrate	C ₂₀ H ₃₄ O ₈
7	31,287	23.68	47	Não identificada	----

Entre todas as análises realizadas, o cromatograma do extrato bruto da macroalga *Curdiea racovitzae* coletada em Punta Plaza, foi a que apresentou uma menor abundância de substâncias químicas. No total foram integrados e numerados cinco picos majoritários (Figura 3.10), cada pico foi descrito com base na sugestão do banco de dados da biblioteca NIST (Tabela 3.5).

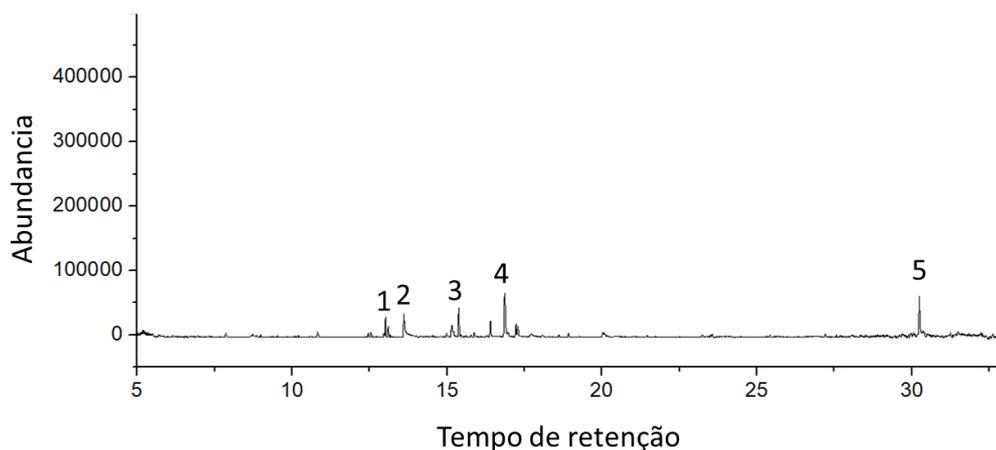


Figura 3.10. Cromatograma obtido do extrato da macroalga *Curdiea racovitazae* coletada em Punta Plaza, por CG-EM.

Tabela 3.5. Substâncias majoritárias detectadas no extrato da macroalga *Curdiea racovitazae* coletada em Punta Plaza, por CG-EM.

Pico	Tempo de retenção	Área (%)	Similaridade (%)	Substância sugerida	Fórmula molecular
1	11,905	8.77	96	Ftalato de dibutilo	$C_{16}H_{22}O_4$
2	12,444	15.08	91	Ácido hexadecanoico	$C_{15}H_{30}O_2$
3	14,415	16.92	83	2,4,4-trimetilciclopentanol	$C_8H_{16}O$
4	16,103	33.68	76	Não identificada	-----
5	31,331	25.54	44	Não identificada	-----

Entre as classes de metabólitos produzidos pelas algas, os lipídios e seus derivados desempenham um papel importante nas funções fisiológicas e ecológicas desses organismos. As análises dos perfis químicos mostraram substâncias pertencentes a diversas classes de produtos naturais. Em todas as amostras foram identificados principalmente ácidos graxos e esteróis, corroborando dados da literatura de outros estudos com macroalgas antárticas (acho que poderia citar).

O principal esterois presente nas macroalgas estudadas foi o colesterol. O perfil químico das amostras mais promissoras como agentes antituberculosos foram descritos no capítulo I, junto com as substâncias majoritárias encontradas neles. Entre os lipídios de maior concentração nestas amostras também foram encontrados ácidos graxos e esteróis.

Diversas propriedades farmacológicas foram atribuídas aos ácidos graxos, como atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antitumoral, antioxidantes e na prevenção de doenças cardíacas (TEIXEIRA et al., 2019). Ácidos graxos como o ácido hexanóico, também conhecido como ácido palmítico é conhecido pelo seu potencial antibiótico, antifúngico, antioxidante, pesticida, antiparasitário e hipocolesterolêmico (BHAGAVATHY et al., 2011; KASANA et al., 2015).

Os esteróis, além de ter diversas atividades biológicas diferentes, como anti-inflamatório, antioxidante, antidiabético e anticâncer, também podem apresentar um significativo papel ecológico atuando na defesa química contra a herbivoria (BLUNT et al., 2016; PEREIRA et al., 2003). O colesterol mostrou propriedades antienvhecimento e neuroprotetoras, anti-inflamatórias, citotóxicas, antifúngicas (BLUNT et al., 2016), atividade antitumoral (AHMED et al., 2011; MAYER; GUSTAFSON, 2003) e antimicrobiana (AL-FADHILI, 2008; BHAGAVATHY et al., 2011; THANIGAIVEL et al., 2015).

Teixeira et al. (2019) investigaram a quantidade lipídica presente nas espécies de macroalgas marinhas *Ascoseira mirabilis*, *Adenocystis utricularis*, *Desmarestia anceps*, *Phaeurus antarcticus* coletadas na Península Antártica, utilizando CG-EM. Os lipídios e seus derivados desempenham papel importante no metabolismo de organismos marinhos e são fontes de substâncias com propriedades terapêuticas e fins biotecnológicos. Nas Rhodophyta o esterol predominante foi o colesterol, nas Phaeophyceae foi o fucosterol, enquanto o esterol dominante do filo Chlorophyta parece variar. Entre os lipídios de maior concentração foram encontrados ácidos graxos e esteróis. Em geral, o fitol e o fucosterol foram os metabólitos mais abundantes em todas as algas marinhas estudadas.

Pereira et al. (2017) isolaram e quantificaram esteróis presentes em seis espécies de Phaeophyceae coletadas na Ilha Rei George: *Adenocystis utricularis*, *Ascoseira mirabilis*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Desmarestia anceps*, *Desmarestia antarctica* e *Himantothallus grandifolius*. Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa em *tandem* (LC-MS / MS). Em geral, o fucosterol foi o mais abundante, seguido pelo β -sitosterol, em cinco das seis algas examinadas.

Rangel et al. (2019) analisaram o perfil químico dos extratos brutos e frações da macroalga *Iridaea cordata* coletada na Antártica por CG-EM, mostrando a presença de ftalatos, ésteres, cetonas, ácidos graxos e ácidos carboxílicos. Santos et al. (2017) determinaram as quantidades de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) em quatro

espécies de algas vermelhas da Antártica avaliadas também neste estudo: *Iridaea cordata*, *Palmaria decipiens*, *Plocamium cartilagineum* e *Pyropia endiviifolia*. Os principais PUFA identificados e quantificados foram o ácido linoléico, ácido di-homo- γ -linolênico, ácido araquidônico e o ácido eicosapentaenoico.

Nos extratos também foram identificados ftalatos, além de outras substâncias poluentes, além de metabolitos comumente encontrados em algas. A presença de contaminantes entre os componentes naturais dos extratos não é um fato inédito (DA SILVA FILHO, 2018; RANGEL et al., 2019) devido às macroalgas possuírem a capacidade de reter e de acumular substâncias presentes no meio em que habitam.

Inicialmente, uma parte dos extratos das duas espécies selecionadas (1,21 g do extrato de *Desmarestia anceps* e 1,09g do extrato de *Curdiea racovitzae*) foram submetidas separadamente a uma filtração utilizando cromatografia líquida a vácuo sob gel de sílica, a partir da qual foram obtidas seis diferentes frações de acordo com a solubilidade das moléculas. Todas as frações obtidas foram investigadas inicialmente por CCD.

A CCD da amostra *Desmarestia anceps* (IP) (Figura 3.11) apresentou diversas bandas de cor laranja no extrato bruto e nas frações, as frações (1), (5) e (6) apresentaram fluorescência azul-branca, e a fração (6) apresentou fluorescência amarela podendo indicar a presença de terpenos, esteróis ou pigmentos vegetais. De acordo com os resultados da CCD, na fração (1) pode se observar uma melhor separação, aparecendo somente uma banda, provavelmente pertencente a um ácido graxo, pela forma da banda.

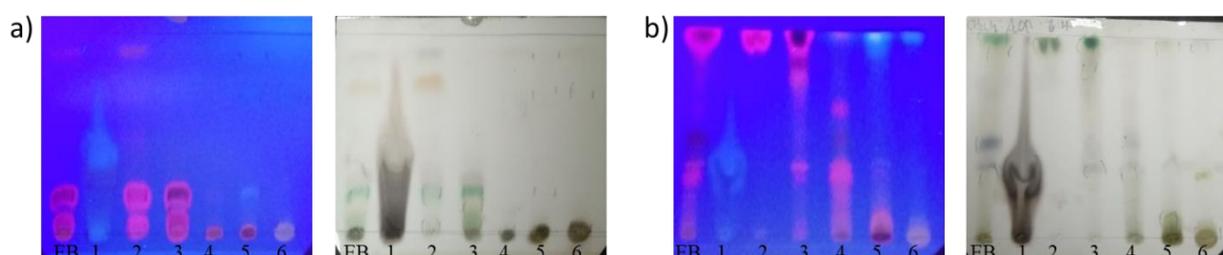


Figura 3.11. CCD da amostra *Desmarestia anceps* (IP) e as seis frações obtidas. FM: a. CH_2Cl_2 100%, b. CH_2Cl_2 :AcOEt (6:4). EB: Extrato bruto. Frações: (1) Hex:AcOEt (9:1), (2) Hex:AcOEt (7.5:2.5), (3) Hex:AcOEt (4:6), (4) AcOEt 100%, (5) AcOEt: MeOH (9:1) e (6) MeOH 100%.

A CCD da amostra *Curdiea racovitzae* (PP) (Figura 3.12) apresentou também diversas bandas de fluorescência laranja no extrato bruto e nas frações (2) (3) e (4), as frações (1), (2), (4) e (5) apresentaram fluorescência azul-branca, nas frações (5) e (6) pode se

observar também fluorescência amarela mas muito fraca podendo indicar a presença de flavonoides ou substâncias fenólicas. As frações (2) e (3) foram as que reuniram a maior quantidade de substâncias quando comparadas com as últimas três frações.

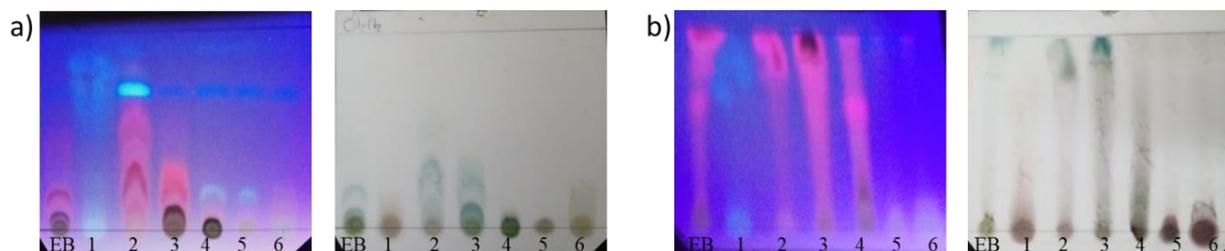


Figura 3.12. CCD da amostra *Curdiea racovitzae* (PP) e as seis frações obtidas. FM: a. CH_2Cl_2 100%, b. CH_2Cl_2 :AcOEt (6:4). EB: Extrato bruto. Frações: (1) Hex:AcOEt (9:1), (2) Hex:AcOEt (7.5:2.5), (3) Hex:AcOEt (4:6), (4) AcOEt 100%, (5) AcOEt: MeOH (9:1) e (6) MeOH 100%.

As frações obtidas também foram avaliadas pelo seu potencial como agentes antituberculosos, além do seu potencial para inibir o mediador inflamatório NO e a citotoxicidade em células de macrófagos murinos com exceção da fração (1) de ambas espécies, utilizando a mesma metodologia explicada no capítulo I. Os resultados são apresentados na Tabela 3.6.

Entre as frações obtidas de *Desmarestia anceps* (IP), as frações (2), (3) e (5) foram as mais ativas contra a cepa laboratorial Mtb H₃₇Rv, e só as frações (2) e (3) apresentaram atividade com a cepa hipervirulenta Mtb M299. Entre todas as frações, a fração mais promissória foi a fração (2), por não apresentar citotoxicidade contra células normais.

Entre as frações obtidas de *Curdiea racovitzae* (PP), as frações (2), (4) e (6) foram as mais ativas contra a cepa laboratorial Mtb H₃₇Rv, e só as frações (2) e (4) apresentaram atividade com a cepa hipervirulenta Mtb M299. Entre todas as frações, a fração mais promissória foi a fração (2), por não apresentar citotoxicidade contra células normais, além de apresentar um IS >16.6, foi a única das frações que apresentou MIC₉₀ de $29,2 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ contra a cepa laboratorial padrão. Além da fração (2), a fração (6) é uma fração promissória ao apresentar atividade antimicobacteriana e não ser tóxica em células normais.

Todas as frações das duas espécies analisadas obtiveram resultados inferiores aos extratos brutos quanto à atividade antimicobacteriana. No caso da espécie *Desmarestia anceps*,

que apresentou citotoxicidade, algumas das frações, apesar de não serem tão ativas quanto o extrato bruto, tiveram a citotoxicidade reduzida.

A baixa atividade antimicobacteriana calculada para todas as frações pode ser atribuída à partição do extrato bruto, já que poderia estar ocorrendo um sinergismo entre as substâncias presentes no extrato bruto, o que proporcionaria a ele grande potencial antimicobacteriano, sem que isso reflita em suas frações. Quando o extrato é particionado, o efeito das frações pode ter características diferentes das apresentadas pelo extrato total, uma vez que não haverá mais sinergia entre as substâncias. Outro aspecto que deve ser levado em consideração é a instabilidade das substâncias ativas, que podem se degradar durante o processo de isolamento e se transformar em substâncias inativas, o que também explicaria os baixos valores encontrados na análise quantitativa da atividade antimicobacteriana das frações analisadas (CECHINEL FILHO; YUNES, 2007).

Tabela 3.6. Atividade antimicobacteriana, imunomodulatória e citotóxica das frações obtidas.

Espécie	Mtb H ₃₇ Rv		Mtb M299		NO	Citotoxicidade
	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	MIC ₅₀ (µg/mL)	MIC ₉₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)
<i>Desmarestia anceps</i>						
Fração 2	16,9 ± 1,3	>100	61,7 ± 1,5	>100	30,0 ± 1,2	>100
Fração 3	16,7 ± 1,3	>100	61,7 ± 1,5	>100	3,7 ± 1,2	11,1 ± 1,1
Fração 4	42,8 ± 1,3	>100	>100	>100	7,0 ± 2,0	23,8 ± 1,2
Fração 5	16,1 ± 1,3	>100	>100	>100	25,2 ± 1,1	68,5 ± 1,1
Fração 6	>100	>100	>100	>100	9,7 ± 1,2	>100
<i>Curdiea racovitzae</i>						
Fração 2	6,0 ± 1,2	29,2 ± 1,5	59,0 ± 1,2	>100	10,7 ± 1,1	>100
Fração 3	30,1 ± 2,1	>100	>100	>100	14,9 ± 1,1	34,6 ± 1,1
Fração 4	17,8 ± 1,5	>100	45,9 ± 14	>100	23,4 ± 1,2	28,1 ± 1,8
Fração 5	46,4 ± 2,7	>100	>100	>100	9,8 ± 1,2	>100
Fração 6	11,6 ± 1,5	>100	>100	>100	56,2 ± 1,1	>100

As frações (1), (2), (3) e (4) das duas espécies também foram avaliadas por CG-EM, utilizando o mesmo método utilizado com os extratos brutos. Os resultados dos cromatogramas são apresentados na Figura 3.13, e as substâncias majoritárias sugeridas pelo banco de dados NIST, são listados na Tabela 3.7.

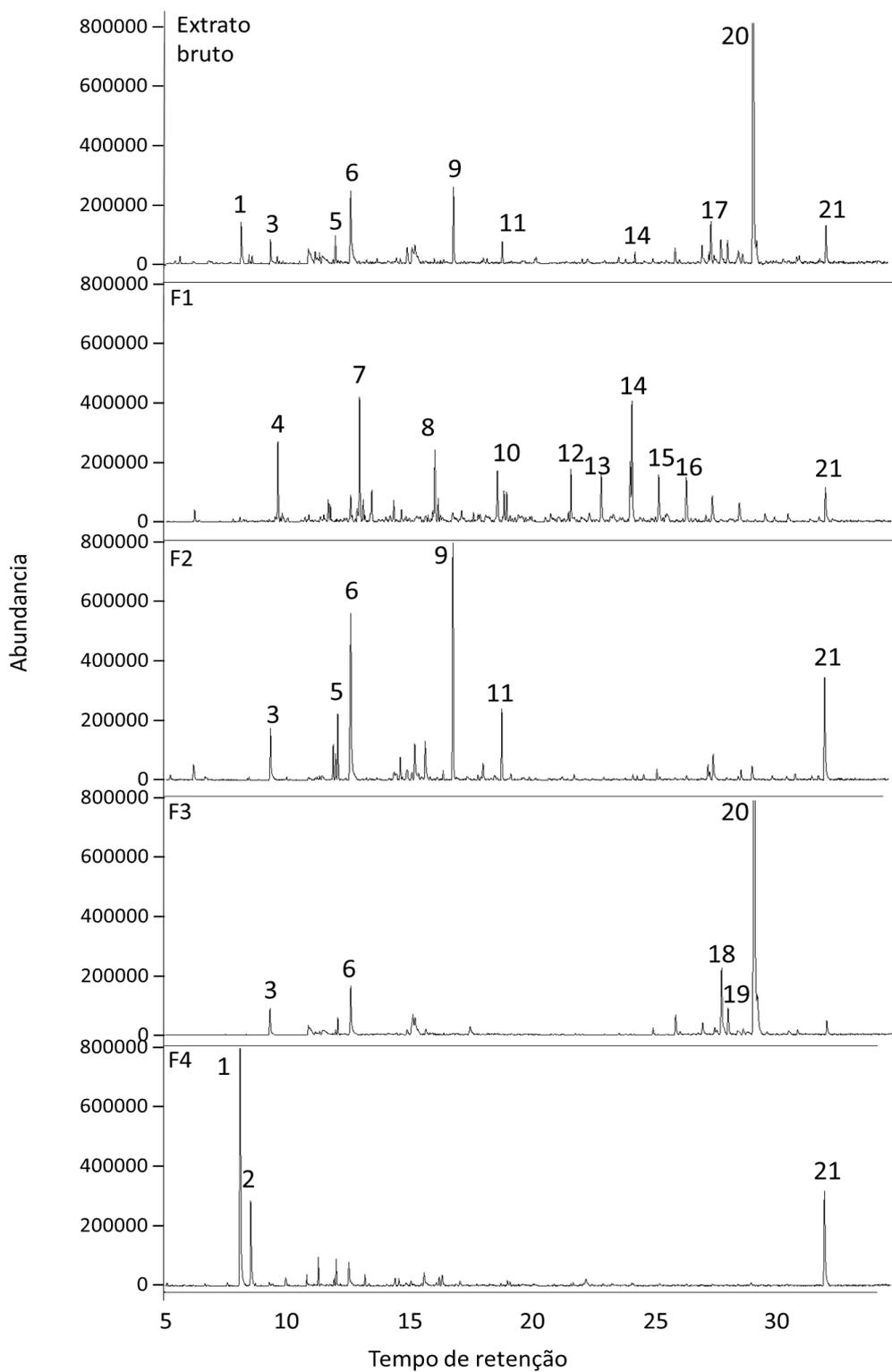


Figura 3.13. Cromatogramas das frações obtidas das amostras *Desmarestia anceps* (IP) EB: Extrato bruto, F1: Hex:AcOEt (9:1), F2: Hex: ACOEt (7.5:2.5), F3: Hex:AcOEt (4:6), F4: AcOEt. Frações ativas contra *Mtb H₃₇Rv*: F2 ($16,9 \pm 1,3$) e F3 ($16,7 \pm 1,3$).

As substâncias majoritárias nas frações mais ativas da espécie *Desmarestia anceps* foram o ácido tetradecanóico, ftalato de dibutilo, ácido ascórbico, acetilcitrato de tributilo, ácido

hexanodióico, éster bis (2-etil-hexil) e uma substância não identificada sugerida como um calixareno na fração 2. Na fração (3) a substância majoritária foi o fucosterol, mas também foi identificado o ácido tetradecanóico, ácido ascórbico e o mesmo calixareno.

Tabela 3.7. Substâncias majoritárias detectadas nos extratos e frações das macroalgas *Desmarestia anceps* (IP) sugeridas por CG-EM.

Pico	TR (min)	Similaridade (%)	Substância sugerida	Fórmula molecular
1	8.021	73	Não identificada	-----
2	8.4	73	Não identificada	-----
3	9,238	95	Ácido tetradecanóico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
4	9.481	96	Z-5-Nonadeceno	C ₁₉ H ₃₈
5	11.897	97	Ftalato de dibutilo	C ₁₆ H ₂₂ O ₄
6	12.430	91	Ácido ascórbico	C ₃₈ H ₆₈ O ₈
7	12.995	98	1-Nonadeceno	C ₁₉ H ₃₈
8	15.938	95	1-Nonadeceno	C ₁₉ H ₃₈
9	16.505	95	Acetilcitrate de tributilo	C ₂₀ H ₃₄ O ₈
10	18.395	93	Ácido hexanodióico, éster bis (2-etil-hexil)	C ₂₂ H ₄₂ O ₄
11	18.439	96	Ácido hexanodióico, éster bis (2-etil-hexil)	C ₂₂ H ₄₂ O ₄
12	21.233	93	Tetrapentacontano	C ₅₄ H ₁₁₀
13	22.459	92	Tetrapentacontano	C ₅₄ H ₁₁₀
14	23.671	95	2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-, (todos-E)	C ₃₀ H ₅₀
15	24.711	93	Tetrapentacontano	C ₅₄ H ₁₁₀
16	25.781	93	Tetrapentacontano	C ₅₄ H ₁₁₀
17	26,767	85	Vitamina E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂
18	27.091	77	Não identificada	-----
19	27.344	77	Não identificada	-----
20	28.376	92	Fucosterol	C ₂₉ H ₄₈ O
21	31.307	44	Não identificada	-----

As quatro primeiras frações da espécie *Curdiea racovitzae* foram analisadas mediante GC-EM. Entre as amostras mais ativas que foram analisadas, a fração 2 apresentou 12 picos majoritários; O ftalato de dibutilo, ácido pentadecanóico e o 3 β colest-5-eno-3-ol foram as substâncias que apresentaram uma maior abundancia.

Na fração 4, foram identificados 10 picos majoritários, sendo as substancias com maior abundância o 7,9-Di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona, 2,6-Di-hexadecanoato de ácido L - (+) - ascórbico, ácido octadecanóico, éster 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etílico do ácido hexadecanóico e 3 β colest-4,6-dien-3-ol.

As frações e os extratos continham numerosas substâncias, das quais, as que puderam ser identificadas estão compiladas nas Tabelas 3.8 e na Figura 3.14. Entre essas substâncias, foram identificados esteroides, ácidos graxos, terpenos e hidrocarbonetos.

As macroalgas são uma fonte importante de metabólitos secundários com grande potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos. Nos últimos anos, as macroalgas atraíram uma atenção crescente de muitas indústrias de diversos ramos, como combustíveis, plásticos, cosméticos, produtos farmacêuticos e alimentos. De fato, a diversidade química das macroalgas oferece a possibilidade de encontrar uma grande variedade de metabólitos primários e secundários, com propriedades e aplicações interessantes. Entre os principais metabólitos podemos encontrar polissacarídeos, lipídios, substâncias fenólicas, substâncias halogenadas, esteróis, terpenos e pequenos peptídeos, entre outras substâncias bioativas (ROSA et al., 2019).

Os esteróis estão entre os constituintes químicos mais importantes das macroalgas. Entre os esteróis encontrados foi identificado o fucosterol, um esterol com atividade antioxidante (LEE et al., 2003), antidiabética (LEE et al., 2004) antiinflamatória (JUNG et al., 2013), antiadipogênica (JUNG et al., 2014), anticancerígena (KHANAVI et al., 2012) e antileishmanial (BECERRA et al., 2015).

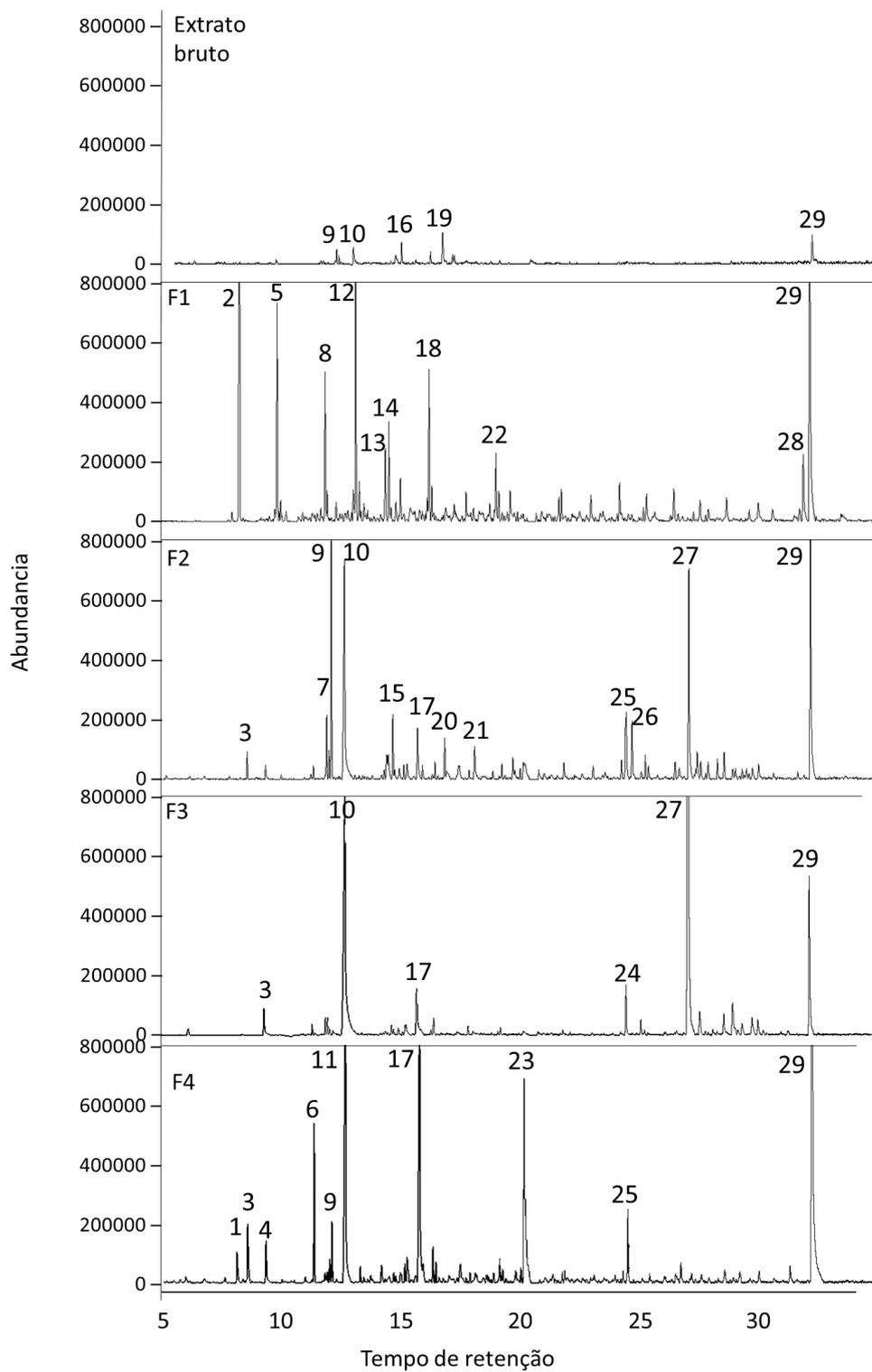


Figura 3.14. Cromatogramas das frações obtidas da amostra *Curdiea racovitzae* (PP) EB: Extrato bruto, F1: Hex:AcOEt (9:1), F2: Hex: ACOEt (7.5:2.5), F3: Hex:AcOEt (4:6), F4: AcOEt. Frações ativas contra *Mtb H37Rv* a. F2 ($6,0 \pm 1,2$) e F4 ($17,8 \pm 1,5$)

Tabela 3.8. Substâncias majoritárias detectadas nos extratos e frações das macroalgas *Curdiea racovitzae* (PP) sugeridas por CG-EM.

Pico	TR (min)	Similaridade (%)	Substância sugerida	Fórmula molecular
1	8.071	72	Não identificada	-----
2	8.434	98	Heptadecano	C ₁₇ H ₃₆
3	8.485	73	Não identificada	-----
4	9.236	93	Ácido tetradecanóico	C ₁₄ H ₂₈ O ₂
5	9,886	97	1-Nonadeceno	C ₁₉ H ₃₈
6	11.191	85	7,9-Di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona	C ₁₇ H ₂₄ O ₃
7	11.711	84	(Z) -7-hexadecenal	C ₁₆ H ₃₀ O
8	11,810	96	Ácido hexadecanóico, éster metílico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂
9	11.905	96	Ftalato de dibutilo	C ₁₆ H ₂₂ O ₄
10	12,444	91	Ácido pentadecanóico	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
11	12.464	91	2,6-Di-hexadecanoato de ácido L - (+) - ascórbico	C ₃₈ H ₆₈ O ₈
13	13.042	97	1-Nonadeceno	C ₁₉ H ₃₈
13	14,240	92	(Z, Z) 9,12 Éster metílico de ácido octadecadienóico	C ₁₉ H ₃₄ O ₂
14	14,383	90	Ácido 7-octadecenóico, éster metílico	C ₁₉ H ₃₆ O ₂
15	14,401	83	1,8-Dioxaciclohexadecano-2,10-diona, 5,6: 12,13-diepoxi-8,16-dimetil-	C ₁₆ H ₂₄ O ₆
16	14,415	83	2,4,4-trimetilciclopentanol	C ₈ H ₁₆ O
17	15.438	90	Ácido octadecanóico	C ₁₈ H ₃₆ O ₂
18	15.983	95	1-Nonadeceno	C ₁₉ H ₃₈
19	16,103	76	Não identificada	-----
20	16.502	93	Acetilcitrate de tributilo	C ₂₀ H ₃₄ O ₈
21	17.693	85	4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido	C ₂₁ H ₄₀ O ₂

22	18,703	94	9-Hexacoseno	C ₂₆ H ₅₂
23	19.692	90	Éster 2-hidroxi-1-(hidroximetil) etílico do ácido hexadecanóico	C ₁₉ H ₃₈ O ₄
24	23.812	90	3β colest-5-eno-3-ol	C ₂₇ H ₄₆ O
25	23.878	89	3β colest-4,6-dien-3-ol	C ₂₇ H ₄₄ O
26	24.083	58	Não identificada	-----
27	26,370	89	3β colest-5-eno-3-ol	C ₂₇ H ₄₆ O
28	31,057	85	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	C ₂₀ H ₄₀ O
29	31.331	44	Não identificada	-----

Entres as substâncias sugeridas pela biblioteca NIST, também foram identificados diferente ácidos graxos. Henry et al. (2002) avaliaram a atividade antioxidante de ácidos graxos saturados e insaturados e verificaram que os ácidos graxos saturados, como os ácidos mirístico, palmítico e láurico, apresentaram a melhor atividade antioxidante nos produtos de origem vegetal.

Ésteres de ácido hexadecanóico foram identificados nas duas amostras. O ácido hexadecanóico, chamado também ácido palmítico, é um ácido graxo saturado de cadeia longa, com potencial antitumoral, antioxidante (ALENCAR et al., 2018; PREMATHILAKA; SILVA, 2016). O ácido tetradecanóico ou ácido mirístico é um ácido graxo saturado de cadeia longa, identificado nas frações ativas do extrato de *D. anceps*, tem atividade antimicrobiana (DESBOIS; SMITH, 2010; LIU; HUANG, 2012), antilarvicidal (SIVAKUMAR et al., 2011); análogos do ácido mirístico tem apresentado também atividade antifúngica (PARANG et al., 1996) e antiviral (PARANG et al., 1997).

Foram identificados também alguns hidrocarbonetos como o 1-nonadeceno o qual possui propriedades antifúngicas, antibacterianas e antivirais (PREMATHILAKA; SILVA, 2016) e o heptadecano que tem atividade antioxidante, anti-inflamatória (KIM et al., 2013) e ajuda na proliferação e diferenciação de osteoblastos a partir de células primarias (LIN et al., 2010).

O triterpenoide 2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno, 2,6,10,15,19,23-hexametil-, (todos-E) –, considerado como das substâncias mais importantes em usos práticos e clínicos, com um enorme potencial nas indústrias nutracêutica e farmacêutica, o qual ajuda a

fortalecer a resistência do corpo e melhorar a imunidade humana também foi identificado. Extratos que contém esta substância, tem apresentado atividade antibacteriana (PREMATHILAKA; SILVA, 2016) larvicida (MANJARI et al., 2014) e anti-inflamatória (LI et al., 2013).

O diterpeno, 4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olido também foi identificado. Esta substância tem sido identificada em extratos com atividade antimicrobiana (OSAMA et al., 2017), antitumoral (CHELLA et al., 2015; SWANTARA et al., 2019), antioxidante (HAMMAMI et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

O 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol ou fitol é um álcool diterpeno acíclico e um constituinte da clorofila. Este produto natural mostra uma ampla gama de atividades biológicas, incluindo efeitos anti-inflamatórios, antialérgicos, imunoestimuladores, antimicrobianos, antioxidantes, antitumoral e anticonvulsivante, além disso foi demonstrado que o fitol modula a transcrição nas células (COSTA et al., 2012; GHANEIAN et al., 2015; PEJIN et al., 2014; RAJAB et al., 1998; SAIKIA et al., 2010).

Por outro lado, o éster 2- (2,2,6-trimetil-7-oxa-biciclo [4.1.0] hept-1-il) -propenil do ácido acético, um derivado epoxi de β -ionona foi identificado nas amostras. A β -ionona é um terpenoide cíclico que apresenta atividade antileishmanial, anti-inflamatória, antifúngica e antibacteriana (GONZÁLEZ-ALAMILLA et al., 2019). O 7-hexadecenal, (Z), foi uma outra substância identificada nas amostras. Esta substância tem atividade antimicrobiana e anti-inflamatória (EL-LEEL; MARAEI; ALY, 2019).

Nas duas amostras e nas suas frações foi sugerida uma substância com tempo de retenção de aproximadamente 31,331 minutos como uma baixa similaridade, esta substância foi sugerida como Pentaciclo [19.3.1.13,7.19,13.115,19] octacosa-1(25),3(28),4,6,9(27), 10,12,15,17,19 (26), 21,23-dodecaeno, um calixareno; substâncias desse tipo tem apresentado potencial anticancerígeno (ALI et al., 2015) e antimicrobiano (LAMARTINE et al., 2002).

Entre as substâncias sugeridas pelo banco de dados também foram identificadas algumas impurezas como o 7,9-Di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona lactona, um oxaspiro, lactona, enona e cetona cíclica, utilizada na fabricação de garrafas de polipropileno utilizadas para embalagens. O citrato de acetiltributilo é uma substância

orgânica utilizada como plastificante o qual também foi identificado entre os picos majoritários.

Ftalatos como o ftalato de dibutil, são petroquímicos usados como plastificantes ou solventes em uma variedade de produtos industriais. Esses produtos químicos são poluentes ambientais detectados em solos, sedimentos, águas terrestres e marinhas e em organismos vivos. Alguns ftalatos tem sido isolados de organismos terrestres e marinhos, incluindo plantas, algas marinhas e caldos de cultura de fungos e bactérias (NAMIKOSHI et al., 2006). Estas substâncias foram identificadas também nas amostras.

Este estudo, como um dos primeiros que investigaram o potencial biotecnológico de macroalgas marinhas da Península Antártica, já fornece resultados de grande relevância, indicando uma rica diversidade química do extratos obtidos destas macroalgas, além de ter identificado as espécies de macroalgas mais promissoras frente as duas atividades testadas, as quais poderão ser objeto de estudo de projetos futuros, ressaltando que a região é uma promissora fonte de moléculas com interesse biotecnológico.

CONCLUSÕES

Foram coletadas 29 amostras de macroalgas marinhas em cinco diferentes locais da Península Antártica. O filo mais abundante foi Rhodophyta (70%), seguidas de Ochrophyta (22%) e Chlorophyta (8%). Variações espaciais na diversidade de espécies foram observadas entre os locais de coleta, e a Ilha Pinguim e Punta Plaza apresentaram a maior diversidade entre os locais estudados.

Algas da Antártica produzem substâncias com atividade antimicobacteriana tornando-as candidatas para o isolamento e identificação de substâncias químicas bioativas. Das amostras analisadas, 62% apresentaram atividade contra a cepa padrão H37Rv, e 31% apresentaram atividade contra a cepa hipervirulenta. As espécies *Desmarestia antarctica* (I), *Curdiea racovitzae* (PP), *Gigartina skottsbergii* (IP), *Iridaea cordata* (IP-PP) e *Pyropia endiviifolia* apresentaram os resultados mais relevantes quanto à atividade antimicobacteriana.

A caracterização química dos extratos brutos mediante CCD revelou diferenças qualitativas e quantitativas (abundância) dos metabólitos nos extratos brutos. As amostras apresentaram perfis diversos e complexos, podendo evidenciar uma maior complexidade química e maior abundância de substâncias em alguns extratos. Variações intraespecíficas foram observadas dependendo do local de coleta tanto para o perfil químico como para a atividade antimicobacteriana revelando a importância de um estudo entre populações na busca de substâncias bioativas.

O ACP permitiu visualizar os cromatogramas segundo o grau de correlação entre eles, podendo observar a similaridade entre cromatogramas segundo o perfil químico das diferentes amostras. Os picos que mais influenciaram tiveram no quarto componente constituíam as substâncias em tempo de retenção 12,4 e 26,3 minutos. As substâncias referentes aos picos descritos sugerida pelo CG-EM foram o ácido ascórbico e o 3 β colest-5-en-3-ol.

Nas análises dos perfis químicos dos extratos brutos por CG-EM, substâncias pertencentes a diversas classes de produtos naturais como ácidos graxos, esteróis e terpenos foram identificados nas amostras ativas. Os ácidos graxos e os esteróis estão

entre as substâncias de maior concentração nos organismos estudados corroborando de outros estudos realizados macroalgas marinhas coletadas na Antártica.

O fracionamento guiado por bioensaios realizado com os extratos brutos de *Desmarestia anceps* (IP) e *Curdiea racovitzae* (PP) os resultados da atividade antimicobacteriana foram inferiores aos extratos brutos. As substâncias majoritárias nas frações, mas ativas foram ácidos graxos e esteróis.

Este trabalho contribui para novas informações químicas sobre a biodiversidade subexplorada de macroalgas pertencentes à Península Antártica, além de aumentar as possibilidades de descoberta de substâncias bioativas que possam ser aplicadas em abordagens biotecnológicas.

REFERÊNCIAS

- ABDELMOHSEN, U. R. et al. Potential of marine natural products against drug-resistant fungal, viral, and parasitic infections. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 17, n. 2, p. e30–e41, 2017.
- ALENCAR, D. B. D. et al. Fatty acid composition from the marine red algae *Pterocladia capillacea* (S. G. Gmelin) Santelices & Hommersand 1997 and *Osmundaria obtusiloba* (C. Agardh) R. E. Norris 1991 and its antioxidant activity. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 90, n. 1, p. 449–459, 1 fev. 2018.
- AL-FADHILI, A. A. Bioactivity and structure of metabolites from marine organisms. India. 2008.
- ALI, Y. et al. Applications of calixarenes in cancer chemotherapy: facts and perspectives. *Drug Design, Development and Therapy*, p. 2831, jun. 2015.
- AMSLER, C. D. et al. Potential chemical defenses against diatom fouling in Antarctic macroalgae. *Botanica Marina*, v. 48, n. 4, 2005.
- AQIL, F. et al. Antimicrobial, antioxidant, and antimutagenic activities of selected marine natural products and tobacco cembranoids. *Drug and Chemical Toxicology*, v. 34, n. 2, p. 167–179, 2011.
- ARAUJO, Z. et al. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico: Revisión. *Investigación Clínica*, v. 49, n. 3, p. 411–441, 2008.
- ARGANDOÑA, V. H. et al. Antifeedant effects of marine halogenated monoterpenes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 24, p. 7029–7033, 2002.
- ARUNKUMAR, K.; SIVAKUMAR, S. R.; RENGASAMY, R. Review on bioactive potential in seaweeds (marine macroalgae): A special emphasis on bioactivity of seaweeds against plant pathogens. *Asian Journal of Plant Sciences*, v. 9, n. 5, p. 227–240, 2010.
- ATCC. HCT 116 (ATCC® CCL-247TM), [s.d.].
- AVILA, C. Ecological and Pharmacological Activities of Antarctic Marine Natural Products. *Planta Medica*, v. 82, n. 09/10, p. 767–774, 24 maio 2016.
- BARCELLOS MARINI, M. et al. Cytotoxic activity of halogenated sesquiterpenes from *Laurencia dendroidea*. *Phytotherapy research: PTR*, v. 32, n. 6, p. 1119–1125, 2018.
- BECERRA, M. et al. Antileishmanial activity of fucosterol recovered from *Lessonia vadosa* Searles (Lessoniaceae) by SFE, PSE and CPC. *Phytochemistry Letters*, v. 11, p. 418–423, 2015.
- BENAVIDES, M. C.; PINZÓN, A. Oxido nítrico: Implicaciones fisiopatológicas. v. 36, p. 45–52, 2018.
- BERNARDI, J. et al. Preliminary data of antioxidant activity of green seaweeds (*Ulvophyceae*) from the Southwestern Atlantic and Antarctic Maritime islands. *Hidrobiológica*, v. 26, n. 2, p. 233–239, 2016.

- BHAGAVATHY, S.; SUMATHI, P.; JANCY SHERENE BELL, I. Green algae *Chlorococcum humicola*-a new source of bioactive compounds with antimicrobial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 1, n. 1, p. S1–S7, 2011.
- BIÁ VENTURA, T. L. et al. Nitric oxide production inhibition and anti-mycobacterial activity of extracts and halogenated sesquiterpenes from the brazilian red alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh. *Pharmacognosy Magazine*, v. 11, n. Suppl 4, p. S611-618, 2015.
- BLOEMBERG, G. V. et al. Acquired Resistance to Bedaquiline and Delamanid in Therapy for Tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 20, p. 1986–1988, 2015.
- BLUNT, J.; MUNRO, M. H. G. (EDS.). *Dictionary of marine natural products*, with CD-ROM. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 2008.
- BLUNT, J. W. et al. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 33, n. 3, p. 382–431, 2016.
- BONACHERA, J. C.; ROSIQUE, M. S. B. Tuberculosis. Diagnóstico y tratamiento. *Neumosur*, p. 11, 2007.
- BORNANCIN, L. et al. Chemical mediation as a structuring element in marine gastropod predator-prey interactions. *Natural Product Reports*, v. 34, n. 6, p. 644–676, 2017.
- BUENO, J. Extractos vegetales y aceites esenciales como fuente de nuevos medicamentos antituberculosos. In: *Plantas Aromáticas y Aceites Esenciales: Estudio y Aplicaciones*. Universidad Industrial de Santander, p. 217–235, 2012.
- BUTLER, M. S. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal of Natural Products*, v. 67, n. 12, p. 2141–2153, 2004.
- CALVA, M. C.; ACEVEDO, M. T. Revisión y actualización general de cáncer colorrectal. *Anales de Radiología*, v. 1, p. 9–115, 2009.
- CAMPBELL, N. A.; URRY, L.; REECE, J. B. *Biología*. Madrid: Médica Panamericana, 2010.
- CARLUCCI, M. J. et al. Antiherpetic and anticoagulant properties of carrageenans from the red seaweed *Gigartina skottsbergii* and their cyclized derivatives: correlation between structure and biological activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 20, n. 2, p. 97–105, abr. 1997.
- CARROLL, A. R. et al. Marine natural products. *Natural Product Reports*, v. 36, n. 1, p. 122–173, 2019.
- CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para a análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. (Eds.). *Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia*. Itajaí: Univali, v. 01. 2007.

- CHELLA, P. P. et al. Discovery of Novel Inhibitors for HER2 from Natural Compounds Present in *Cayratia trifolia*: An In silico Analysis. *International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research*, v. 6, n. 3, p. 164–168, 2015.
- CHEN, J.-W. et al. Anticancer agent-based marine natural products and related compounds. *Journal of Asian Natural Products Research*, v. 17, n. 2, p. 199–216, 2015.
- CHEUNG, R. C. F. et al. Marine natural products with anti-inflammatory activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 4, p. 1645–1666, 2016.
- CHINCHILLA, M. et al. The role of nitric oxide (NO) in the normal physiology of the airway and its implications on the pathophysiology of pulmonary hypertension. *Revista Med*, v. 16, n. 2, p. 215–225, 2008.
- CIRM. Programa Antártico Brasileiro. Disponível em: <<https://www.marinha.mil.br/secirm/proantar>>. Acesso em: 24 jan. 2018.
- COPP, B. R. Antimycobacterial natural products. *Natural Product Reports*, v. 20, n. 6, p. 535, 2003.
- COPP, B. R.; PEARCE, A. N. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat. Prod. Rep.*, v. 24, n. 2, p. 278–297, 2007.
- COSTA, J. P. et al. Anticonvulsant effect of phytol in a pilocarpine model in mice. *Neuroscience Letters*, v. 523, n. 2, p. 115–118, 2012.
- COUTINHO, R. et al. V Redealgas Workshop: biotechnology and sustainability. *Journal of Applied Phycology*, v. 29, n. 2, p. 663–664, 2017.
- COX, J. S. Importancia Geopolítica del Continente Antártico. *Revismar*, v. 6, p. 12, 2008.
- CRUCES, E.; HUOVINEN, P.; GÓMEZ, I. Interactive effects of UV radiation and enhanced temperature on photosynthesis, phlorotannin induction and antioxidant activities of two sub-Antarctic brown algae. *Marine Biology*, v. 160, n. 1, p. 1–13, 2013.
- DA GAMA, B. A. P. et al. Antifouling activity of natural products from Brazilian seaweeds. *Botanica Marina*, v. 51, n. 3, 2008.
- DA SILVA FILHO, I. J. Estudo bioguiado da macroalga marinha da Antártica *Desmarestia menziesii* para isolamento de substâncias biológicas. Dissertação (Mestrado)—São Paulo: Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, 2018.
- DAHMS, H.; DOBRETSOV, S. Antifouling Compounds from Marine Macroalgae. *Marine Drugs*, v. 15, n. 9, p. 265, 2017.
- DALETOS, G. et al. Antimycobacterial Metabolites from Marine Invertebrates: Antimycobacterial Metabolites from Marine Invertebrates. *Archiv der Pharmazie*, v. 349, n. 10, p. 763–773, 2016.
- DE ARRUDA, A. O. Estabelecimento de perfil fitoquímico por cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE) para avaliação da qualidade das cascas do caule de *libidibia ferrea* (mart.) L.p. queiroz. In: XXIII CONIC. Recife: 2015

- DE SOUZA NETO, M. A. *Ziziphus joazeiro* Martius: Estudo Fitoquímico do Extrato Hidroetanólico das Folhas, Fracionamento Bioguiado Anti-Candida e Avaliação do Efeito Protetor em Modelo de Doença Inflamatória Intestinal. Natal-RN: Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2016.
- DESBOIS, A. P.; SMITH, V. J. Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 85, n. 6, p. 1629–1642, 2010.
- DIOGO, J. V. et al. Antiviral activity of lambda-carrageenan prepared from red seaweed (*Gigartina skottsbergii*) against BoHV-1 and SuHV-1. *Research in Veterinary Science*, v. 98, p. 142–144, 2015.
- DONG, M.; PFEIFFER, B.; ALTMANN, K.-H. Recent developments in natural product-based drug discovery for tuberculosis. *Drug Discovery Today*, v. 22, n. 3, p. 585–591, 2017.
- DONIA, M.; HAMANN, M. T. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 3, n. 6, p. 338–348, 2003.
- DOS SANTOS SOUZA MARINHO, R. et al. Antiviral activity of 7-keto-stigmasterol obtained from green Antarctic algae *Prasiola crispera* against equine herpesvirus 1. *Journal of Applied Phycology*, v. 29, n. 1, p. 555–562, 2017.
- EL-HOSSARY, E. M. et al. Antifungal potential of marine natural products. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 126, p. 631–651, 2017.
- EL-LEEL, O. F. A.; MARAEI, R. W.; ALY, A. A. E.-H. Studying the response of *Nigella sativa* plants to different fertilizers. *Analele Universitatii din Oradea, Fascicula Biologie*. n. 1, p. 7, 2019.
- FAULKNER, D. J. Marine natural products (1999). *Natural Product Reports*, v. 18, n. 1, p. 1–49, 2001.
- FERNÁNDEZ, M.; HERNÁNDEZ, I.; REGUEIRA, S. Bioactivos marinos en el tratamiento del cáncer. *Revista Electrónica Dr. Zoilo E. Marinello Vidaurreta*, v. 40, n. 7, p. 10, 2015.
- FERNANDO, I. P. S.; NAH, J.-W.; JEON, Y.-J. Potential anti-inflammatory natural products from marine algae. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 48, p. 22–30, 2016.
- FRASSINI, R. et al. Chemical characterization and cytotoxic activity of Antarctic macroalgae extracts against colorectal cancer. *Advances in Biological Chemistry*, v. 09, n. 05, p. 167–177, 2019.
- FRIED, B.; SHERMA, J. *Thin-Layer Chromatography, Revised and Expanded*. CRC Press, 1999.
- FURBINO, L. E. et al. Diversity patterns, ecology and biological activities of fungal communities associated with the endemic macroalgae Across the Antarctic Peninsula. *Microbial Ecology*, v. 67, n. 4, p. 775–787, 2014.
- FUSETANI, N. (ED.). *Drugs from the sea*. Basel; New York: Karger, 2000.

- GERWICK, W. Chemical variation in the tropical seaweed *Styopodium zonale* (dictyotaceae). *Phytochemistry*, v. 24, n. 6, p. 1279–1283, 1985.
- GHANEIAN, M. T. et al. Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. *Environmental Health Engineering and Management Journal* 2015; v. 2, n. 1: p. 13–16, 2015.
- GOMEZ-FLORES, R. et al. Determination of MICs for *Mycobacterium avium*-M. intracellulare complex in liquid medium by a colorimetric method. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 7, p. 1842–1846, 1995.
- GONZÁLEZ-ALAMILLA, E. N. et al. Chemical Constituents of *Salix babylonica* L. and their Antibacterial Activity against Gram-Positive and Gram-Negative Animal Bacteria. *Molecules*, v. 24, n. 16, p. 2992, 2019.
- GRIESS, J. P. *Philos. Journal of Biology and Chemical*, v. 537, 1864.
- HAMMAMI, S. et al. Essential Oil Constituents and Antioxidant Activity of *Asplenium* Ferns. *Journal of Chromatographic Science*, v. 54, n. 8, p. 1341–1345, 2016.
- HANSON, J. *Natural Products the Secondary Metabolites*. UK: Royan Society of Chemistry, 2003.
- HASEGAWA, T.; FISHING, Y. U. Coloring behavior of phenols by iron (III) chloride on TLC. *The Chemical Society of Japan*, v. 39, n. 6, p. 74–75, 1991.
- HAY, M. E. Marine Chemical Ecology: Chemical signals and cues structure marine populations, communities, and ecosystems. *Annual Review of Marine Science*, v. 1, n. 1, p. 193–212, 2009.
- HENRY, G. E. et al. Antioxidant and Cyclooxygenase Activities of Fatty Acids Found in Food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 8, p. 2231–2234, 2002.
- HORSBURGH, C. R.; BARRY, C. E.; LANGE, C. Treatment of Tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, v. 373, n. 22, p. 2149–2160, 2015.
- HOU, X.-M. et al. Marine natural products as potential anti-tubercular agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 165, p. 273–292, 2019.
- HU, Y. et al. Statistical research on the bioactivity of new marine natural products discovered during the 28 years from 1985 to 2012. *Marine Drugs*, v. 13, n. 1, p. 202–221, 2015.
- HURD, C. L. et al. *Seaweed Ecology and Physiology*. Cambridge University Press, 2014.
- HUSSAIN, S.; FAREED, S.; ANSARI, S. Marine natural products: A lead for Anti-cancer. *INDIAN J. MAR. SCI.*, v. 41, n. 1, p. 13, 2012.
- INCA. Estatísticas de câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 28 mar. 2020.
- IZAGUIRRE, I.; MATALONI, G. Antártida, descubriendo el continente blanco. Editorial Del Nuevo Extremo, 2000.
- JORK, H. (ED.). *Thin-layer chromatography: reagents and detection methods*. Weinheim (Federal Republic of Germany); New York, NY (USA): VCH, 1990a.

- JORK, H. (ED.). Thin-layer chromatography: reagents and detection methods. Vol. 1 a: Physical and chemical detection methods Fundamentals, reagents I. Weinheim: VCH, 1990b.
- JUNG, H. A. et al. Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. *Food and Chemical Toxicology*, v. 59, p. 199–206, 2013.
- JUNG, H. A. et al. Anti-adipogenic activity of the edible brown alga *Ecklonia stolonifera* and its constituent fucosterol in 3T3-L1 adipocytes. *Archives of Pharmacal Research*, v. 37, n. 6, p. 713–720, 2014.
- KAMIMOTO, K. Antibacterial substances extracted from seaweeds. Effects of extracts from seaweeds on the growth of some acid-fast bacteria. *Nippon Saikingaku Zasshi*, v. 11, p. 307–313, 1956.
- KASANAHA, N. et al. Antibacterial Compounds from Red Seaweeds (Rhodophyta). *Indonesian Journal of Chemistry*, v. 15, n. 2, p. 201–209, 2015.
- KASHIWAGI, M. et al. Antineoplastic evaluation of pacific basin marine algae. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 69, n. 6, p. 735–738, jun. 1980.
- KELECOM, A. Secondary metabolites from marine microorganisms. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 74, n. 1, p. 151–170, 2002.
- KHAN, R. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 26, n. 5, p. 739–753, 2018.
- KHANA VI, M. et al. Cytotoxicity of fucosterol containing fraction of marine algae against breast and colon carcinoma cell line. *Pharmacognosy Magazine*, v. 8, n. 29, p. 60, 2012.
- KIM, D. H. et al. Molecular Study of Dietary Heptadecane for the Anti-Inflammatory Modulation of NF- κ B in the Aged Kidney. *PLoS ONE*, v. 8, n. 3, p. e59316, 26 mar. 2013.
- KIM, H. J. et al. Anticancer Activity of Sulfated Polysaccharides Isolated from the Antarctic Red Seaweed *Iridaea cordata*. *Ocean and Polar Research*, v. 38, n. 2, p. 129–137, 2016.
- KIM, S.-K. Springer handbook of marine biotechnology. 1st edition ed. New York, NY: Springer Berlin Heidelberg, 2014.
- KIM, S.-K.; CHOJNACKA, K. Marine Algae Extracts: Processes, Products, and Applications. John Wiley & Sons, 2015.
- KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; DE NYS, R. Halogenated Monoterpenes from *Plocamium costatum* and Their Biological Activity. *Journal of Natural Products*, v. 62, n. 2, p. 383–385, 1999.
- KÖNIG, G. M.; WRIGHT, A. D.; LINDEN, A. *Plocamium hamatum* and its monoterpenes: chemical and biological investigations of the tropical marine red alga. *Phytochemistry*, v. 52, n. 6, p. 1047–1053, 1999.
- KÖNIG, G.; WRIGHT, A.; FRANZBLAU, S. Assessment of Antimycobacterial Activity of a Series of Mainly Marine Derived Natural Products. *Planta Medica*, v. 66, n. 04, p. 337–342, 2000.

- KOTHARI, V.; GUPTA, A.; NARANIWAL, M. Extraction methods for preparation of bioactive plant extracts A comparative study. Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012.
- KUMAR, M. S.; ADKI, K. M. Marine natural products for multi-targeted cancer treatment: A future insight. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 105, p. 233–245, 2018.
- LAMARTINE, R. et al. Antimicrobial activity of calixarenes. *Comptes Rendus Chimie*, v. 5, n. 3, p. 163–169, 2002.
- LEE, S. et al. Anti-oxidant activities of fucosterol from the marine algae *Pelvetia siliquosa*. *Archives of Pharmacal Research*, v. 26, n. 9, p. 719–722, 2003.
- LEE, Y. S. et al. Anti-Diabetic activities of fucosterol from *Pelvetia siliquosa*. *Archives of Pharmacal Research*, v. 27, n. 11, p. 1120–1122, 2004.
- LI, C. et al. Two New 3,4,9,10- seco -Cycloartane Type Triterpenoids from *Illicium difengpi* and Their Anti-Inflammatory Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, p. 1–9, 2013.
- LI, G.; LOU, H.-X. Strategies to diversify natural products for drug discovery. *Medicinal Research Reviews*, v. 38, n. 4, p. 1255–1294, 2018.
- LIN, X.-H. et al. Effects of volatile components and ethanolic extract from *Eclipta prostrata* on proliferation and differentiation of primary osteoblasts. *Molecules*, v. 15, n. 1, p. 241–250, 2010.
- LIU, C.-H.; HUANG, H.-Y. Antimicrobial Activity of Curcumin-Loaded Myristic Acid Microemulsions against *Staphylococcus epidermidis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 60, n. 9, p. 1118–1124, 2012.
- LOZANO, J. A. Tuberculosis. Patogenia, diagnóstico y tratamiento. v. 21, p. 6, 2002.
- MACGOWAN, A.; MACNAUGHTON, E. Antibiotic resistance. *Medicine*, v. 45, n. 10, p. 622–628, 2017.
- MACHADO, F. L. DA S. et al. Chemical diversity and antileishmanial activity of crude extracts of *Laurencia* complex (Cerámiales, Rhodophyta) from Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, n. 6, p. 635–643, 2014.
- MAHER, D. et al. Tratamiento de la tuberculosis: Directrices para los programas nacionales. Organización Mundial de la Salud, p. 81, 1997.
- MANDAL, S. C.; MANDAL, V.; DAS, A. K. Essentials of botanical extraction: principles and applications. Amsterdam ; Boston: Elsevier/AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2015.
- MANJARI, M. S. et al. Chemical composition and larvicidal activity of plant extracts from *Clausena dentata* (Willd) (Rutaceae) against dengue, malaria, and filariasis vectors. *Parasitology Research*, v. 113, n. 7, p. 2475–2481, 2014.
- MARCO VENTURA, J. A. Química de los productos naturales: aspectos fundamentales del metabolismo secundario. Madrid: Síntesis, 2010.
- MARTIN, S. A History of Antarctica. Rosenberg Publishing, 2013.

- MARTINS, C. D. L. et al. Antioxidant properties and total phenolic contents of some tropical seaweeds of the Brazilian coast. *Journal of Applied Phycology*, v. 25, n. 4, p. 1179–1187, 2013.
- MARTINS, R. M. et al. Macroalgae Extracts from Antarctica Have Antimicrobial and Anticancer Potential. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 8, 2018.
- MASCHEK, J. A. et al. The Pursuit of Potent Anti-influenza Activity from the Antarctic Red Marine Alga *Gigartina skottsbergii*. In: GANG, D. R. (Ed.). *The Biological Activity of Phytochemicals*. New York, NY: Springer New York, 2011. p. 1–12.
- MATHAYAN, M.; SUNDAR, R.; ANBARASU, S. Antimycobacterial activity of marine *Sargassum swartzii* extracts against *Mycobacterium tuberculosis*. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, v. 13, n. 2, p. 130, 2018.
- MAYER, A. M. S. et al. Marine pharmacology in 2007–8: Marine compounds with antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the immune and nervous system, and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 153, n. 2, p. 191–222, 2011.
- MAYER, A. M. S.; GUSTAFSON, K. R. Marine pharmacology in 2000: Antitumor and cytotoxic compounds. *International Journal of Cancer*, v. 105, n. 3, p. 291–299, 2003.
- MCTI. CIÊNCIA ANTÁRTICA PARA O BRASIL: Plano de Ação 2013-2022. Brasília. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/inctcriosfera/arquivos/231154.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2018.
- MIGLIORI, G. B. et al. Tuberculosis. European Respiratory Society, 2018.
- MONTALVÃO, S. Screening of marine natural products and their synthetic derivatives for antimicrobial and antiproliferative properties. *Dissertationes Scholae Doctoralis Ad Sanitatem Investigandam Universitatis Helsinkiensis*, 2016.
- MOO-PUC, R.; ROBLEDO, D.; FREILE-PELEGRÍN, Y. Actividad citotóxica y antiproliferativa in vitro de macroalgas marinas de Yucatán, México. *Ciencias marinas*, v. 35, n. 4, p. 345–358, 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- MOURITSEN, O. G.; MOURITSEN, J. D. *Seaweeds: Edible, Available, and Sustainable*. University of Chicago Press, 2013.
- MUDIMU, O. et al. Biotechnological screening of microalgal and cyanobacterial strains for biogas production and antibacterial and antifungal effects. *Metabolites*, v. 4, n. 2, p. 373–393, 2014.
- MURPHY, C. et al. The potential of seaweed as a source of drugs for use in cancer chemotherapy. *Journal of Applied Phycology*, v. 26, n. 5, p. 2211–2264, 2014.
- MYSTIKOU, A. et al. Seaweed biodiversity in the south-western Antarctic Peninsula: surveying macroalgal community composition in the Adelaide

- Island/Marguerite Bay region over a 35-year time span. *Polar Biology*, v. 37, n. 11, p. 1607–1619, 2014.
- NAMIKOSHI, M. et al. Natural Abundance ¹⁴C Content of Dibutyl Phthalate (DBP) from Three Marine Algae. *Marine Drugs*, v. 4, n. 4, p. 290–297, 2006.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. *Marine Biotechnology in the Twenty-First Century: Problems, Promise, and Products*. Washington, D.C.: National Academies Press, 2002.
- NAVARRO, N. P.; HUOVINEN, P.; GÓMEZ, I. Stress tolerance of Antarctic macroalgae in the early life stages. *Revista Chilena de Historia Natural*, v. 89, n. 1, 2016.
- NGUTA, J. M. et al. Current perspectives in drug discovery against tuberculosis from natural products. *International Journal of Mycobacteriology*, v. 4, n. 3, p. 165–183, 2015.
- NIELSEN, N.-P. V.; CARSTENSEN, J. M.; SMEDSGAARD, J. Aligning of single and multiple wavelength chromatographic profiles for chemometric data analysis using correlation optimised warping. *Journal of Chromatography A*, v. 805, n. 1–2, p. 17–35, 1998.
- NOCCHI, N. et al. Detection of a chemical cue from the host seaweed *Laurencia dendroidea* by the associated mollusc *Aplysia brasiliiana*. *PLOS ONE*, v. 12, n. 11, 2017.
- NORA DE SOUZA, M. V. Marine Natural Products Against Tuberculosis. *The Scientific World JOURNAL*, v. 6, p. 847–861, 2006.
- NÚÑEZ-PONS, L.; AVILA, C. Natural products mediating ecological interactions in Antarctic benthic communities: a mini-review of the known molecules. *Natural Product Reports*, v. 32, n. 7, p. 1114–1130, 2015.
- O’CONNOR, K. *Seaweed: A Global History*. [s.l.] Reaktion Books, 2017.
- OKUNADE, A.; ELVIN-LEWIS, M. P. F.; LEWIS, W. H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. *Phytochemistry*, v. 65, n. 8, p. 1017–1032, 2004.
- OLIVEIRA, A. S. et al. Inter- and intrapopulation variation in the defensive chemistry of the red seaweed *Laurencia dendroidea* (Ceramiales, Rhodophyta). *Phycologia*, v. 52, n. 2, p. 130–136, 2013.
- OLIVEIRA, E. C. et al. The seaweed flora of Admiralty Bay, King George Island, Antarctic. *Polar Biology*, v. 32, n. 11, p. 1639–1647, 2009.
- OMS. Tuberculosis. Disponível em: <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis>>. Acesso em: 28 jan. 2019.
- OMS. OMS | Cáncer. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/cancer/es/>>. Acesso em: 27 mar. 2020.
- ORME, I. Tuberculosis Drug Screening Program. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 7, p. 1943–1946, 2001.

- OSAMA, A. et al. Phytochemical Composition and Evaluation of Antimicrobial Activity of *Blepharis linariifolia* (Pers.) Seeds. *Asian Journal of Chemical Sciences*, p. 1–6, 2017.
- PACHECO, B. S. et al. Cytotoxic Activity of Fatty Acids from Antarctic Macroalgae on the Growth of Human Breast Cancer Cells. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v. 6, 2018.
- PÁEZ-HERNÁNDEZ, G. et al. Uso de aceites esenciales como agentes quimiopreventivos contra el cáncer colorrectal. *Revista Médico-Científica de la Secretaría de Salud Jalisco*, v. 6, n. 3, p. 199, 2019.
- PAL, A.; KAMTHANIA, M. C.; KUMAR, A. Bioactive Compounds and Properties of Seaweeds—A Review. *Open Access Library Journal*, v. 01, n. 04, p. 1–17, 2014.
- PANGESTUTI, R.; KIM, S.-K. Biological activities and health benefit effects of natural pigments derived from marine algae. *Journal of Functional Foods*, v. 3, n. 4, p. 255–266, 2011.
- PARADAS, W. C. et al. A Novel Antifouling Defense Strategy from Red Seaweed: Exocytosis and Deposition of Fatty Acid Derivatives at the Cell Wall Surface. *Plant & Cell Physiology*, v. 57, n. 5, p. 1008–1019, 2016.
- PARANG, K. et al. Synthesis and Antifungal Activities of Myristic Acid Analogs. *Archiv der Pharmazie*, v. 329, n. 11, p. 475–482, 1996.
- PARANG, K. et al. In vitro antiviral activities of myristic acid analogs against human immunodeficiency and hepatitis B viruses. *Antiviral Research*, v. 34, n. 3, p. 75–90, 1997.
- PARRA, J. F. et al. Consenso Nacional Cáncer Colorrectal Diagnóstico y Tratamiento. *Revista Venezolana de Oncología*, v. 24, n. 2, p. 160–189, 2012.
- PEJIN, B.; KOJIC, V.; BOGDANOVIC, G. An insight into the cytotoxic activity of phytol at in vitro conditions. *Natural Product Research*, v. 28, n. 22, p. 2053–2056, 2014.
- PELLIZZARI, F. et al. Diversity and spatial distribution of seaweeds in the South Shetland Islands, Antarctica: an updated database for environmental monitoring under climate change scenarios. *Polar Biology*, v. 40, n. 8, p. 1671–1685, 2017.
- PEREIRA, C. M. P. et al. Extraction of sterols in brown macroalgae from Antarctica and their identification by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Journal of Applied Phycology*, v. 29, n. 2, p. 751–757, 2017.
- PEREIRA, C. M. P.; COLEPICOLO, P.; OLIVEIRA DE SOUZA, P. Antitumor activity of extracts from Antarctic macroalgae. LAP Lambert Academic Publishing, 2015.
- PEREIRA, L.; NETO, J. M. *Marine Algae: Biodiversity, Taxonomy, Environmental Assessment, and Biotechnology*. CRC Press, 2014.
- PEREIRA, R. C. et al. Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*. *Brazilian Journal of Biology*, v. 63, n. 4, p. 665–672, 2003.
- POSADA-SWAFFORD, Á. La investigación en Antártida es crucial para entender las variaciones del clima y sus consecuencias. Disponible en:

<<https://www.scientificamerican.com/espanol/noticias/la-investigacion-en-antartida-es-crucial-para-entender-las-variaciones-del-clima-y-sus-consecuencias/>>. Acesso em: 2 mar. 2020.

- PREMATHILAKA, U. L. R. R.; SILVA, G. M. S. W. Bioactive compounds and antioxidant activity of *Bunchosia armenica*. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 5, n. 10, p. 1237–1247, 2016.
- PUJOL, C. A. et al. Antiviral Activity of a Carrageenan from *Gigartina skottsbergii* against Intraperitoneal Murine Herpes simplex Virus Infection. *Planta Medica*, v. 72, n. 2, p. 121–125, 2006.
- QUAN, D. et al. New tuberculosis drug leads from naturally occurring compounds. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 56, p. 212–220, 2017.
- RAJA, R. et al. A Perspective on the Biotechnological Potential of Microalgae. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 77–88, 2008.
- RAJAB, M. et al. Antimycobacterial Activity of (E)-Phytol and Derivatives: A Preliminary Structure-Activity Study. *Planta Medica*, v. 64, n. 01, p. 2–4, 1998.
- RAJPUT, A. et al. Characterization of HCT116 Human Colon Cancer Cells in an Orthotopic Model. *Journal of Surgical Research*, v. 147, n. 2, p. 276–281, 2008.
- RANGEL, K. C. et al. Antileishmanial activity of the Antarctic red algae *Iridaea cordata* (Gigartinales; Rhodophyta). *Journal of Applied Phycology*, v. 31, n. 2, p. 825–834, 2019.
- RANGEL, K. C. Avaliação do potencial fotoprotetor e antioxidante de extratos de macroalgas vermelhas da Antártica. Doutorado em Medicamentos e Cosméticos—Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2019.
- REACH DEVICES. Thin Layer Chromatography stains. 2017. Disponível em: <http://www.reachdevices.com/TLC_stains.html>. Acesso em: 7 mar. 2020.
- RIBEIRO, A. et al. Antiviral activity of extracts from Brazilian seaweeds against herpes simplex virus. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, n. 4, 2012.
- RIFFENBURGH, B. *Encyclopedia of the Antarctic*. Taylor & Francis, 2007.
- ROSA, G. P. et al. Seaweed Secondary Metabolites with Beneficial Health Effects: An Overview of Successes in *In Vivo* Studies and Clinical Trials. *Marine Drugs*, v. 18, n. 1, p. 8, 2019.
- SACRISTÁN-SORIANO, O. et al. Potential chemical defenses of Antarctic benthic organisms against marine bacteria. *Polar Research*, v. 36, n. 1, 2017.
- SAIKIA, D. et al. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, n. 2, p. 508–512, 2010.
- SAKATA, K. et al. Chemical studies on feeding inhibitors for marine herbivores. Part II. Halogenated terpenes isolated from the red alga *Plocamium leptophyllum* as feeding inhibitors for marine herbivores. *NIPPON SUISAN GAKKAISHI*, v. 57, n. 4, p. 743–746, 1991.
- SALVADOR-NETO, O. et al. Larvicidal Potential of the Halogenated Sesquiterpene (+)-Obtusol, Isolated from the Alga *Laurencia dendroidea* J. Agardh (Ceramiaceae):

- Rhodomelaceae), against the Dengue Vector Mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus) (Diptera: Culicidae). *Marine Drugs*, v. 14, n. 2, 2016.
- SAMBAMURTY, A. V. Textbook of Algae. K. International Pvt Ltd, 2017.
- SANCHEZ, R. A. Antártida: introducción a un continente remoto. Editorial Albatros, 2007.
- SANTOS, M. A. Z. et al. Antarctic red macroalgae: a source of polyunsaturated fatty acids. *Journal of Applied Phycology*, v. 29, n. 2, p. 759–767, 2017.
- SANTOS, O. C. S. et al. Investigation of biotechnological potential of sponge-associated bacteria collected in Brazilian coast. *Letters in Applied Microbiology*, v. 60, n. 2, p. 140–147, 2015.
- SARAVANAKUMAR, D. Antimycobacterial activity of the red algae *Gelidium pristoides*, *Plocamium corallorhiza* and *Polysiphonia virgata*. *Pharmaceutical Biology*. Doctor Thesis. University of Cape Town, 2006.
- SARAVANAKUMAR, D. E. M. et al. Antimycobacterial Activity of the Red Alga *Polysiphonia virgata*. *Pharmaceutical Biology*, v. 46, n. 4, p. 254–260, 2008.
- SCHORIES, D.; KOHLBERG, G. *Marine Wildlife King George Island Antarctica*. 1° edition ed. Dirk Schories Publications, 2016.
- SEVAK, H. P. Potential chemical defenses against diatom fouling in macroalgae from the Antarctic Peninsula: insights from bioassay guided fractionation. PhD Thesis—University of Alabama at Birmingham, Graduate School, 2010.
- SEVAK, H. P. et al. Algicidal activity and potential antifouling defenses in macroalgae from the western Antarctic Peninsula including probable synergistic effects of multiple compounds. *Botanica Marina*, v. 55, n. 3, 2012.
- SHARMA, S. S. *Breaking the Ice in Antarctica: The First Indian Wintering in Antarctica*. New Age International Publisher, 2001.
- SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento*. Artmed Editora, 2016a.
- SIMÕES, C. O. et al. *Farmacognosia Do Produto Natural Ao Medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2016b.
- SIQUEIRA et al. *Introdução à cromatografia com ênfase em material biológico*. EDIPUCRS, 2003.
- SIVAKUMAR, R. et al. Larvicidal and repellent activity of tetradecanoic acid against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Culex quinquefasciatus* (Say.) (Diptera: Culicidae). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 4, n. 9, p. 706–710, 2011.
- SMIT, A. J. Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *Journal of Applied Phycology*, v. 16, n. 4, p. 245–262, 2004.
- SNELGROVE, P. An Ocean of Discovery: Biodiversity Beyond the Census of Marine Life. *Planta Medica*, v. 82, n. 09/10, p. 790–799, 2016.
- SOARES, ANGÉLICA. R.; PEREIRA, R. C.; SOARES, A. G. Produtos naturais marinhos. In: *Ecologia Marinha*. Rio de Janeiro: Moderna, *in press*.

- SOARES, D. C. et al. The Brown Alga *Styopodium zonale* (Dictyotaceae): A Potential Source of Anti-Leishmania Drugs. *Marine Drugs*, v. 14, 2016.
- SPAVIERI, J. et al. Antimycobacterial, antiprotozoal and cytotoxic potential of twenty-one brown algae (phaeophyceae) from British and Irish waters. *Phytotherapy Research*, v. 24, n. 11, p. 1724–1729, 2010.
- SRIVASTAVA, M. High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC). Springer Science & Business Media, 2010.
- STAGOS, D. et al. Chemoprevention of liver cancer by plant polyphenols. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 6, p. 2155–2170, 2012.
- STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. *Scientia Chromatographica*, v. 1, n. 3, p. 19, 2009.
- STILWELL, J. D.; LONG, J. A. Frozen in Time: Prehistoric Life in Antarctica. Csiro Publishing, 2011.
- STIRK, W. A.; REINECKE, D. L.; VAN STADEN, J. Seasonal variation in antifungal, antibacterial and acetylcholinesterase activity in seven South African seaweeds. *Journal of Applied Phycology*, v. 19, n. 3, p. 271–276, 2007.
- SÜZGEÇ-SELÇUK, S. et al. Evaluation of Turkish seaweeds for antiprotozoal, antimycobacterial and cytotoxic activities. *Phytotherapy Research*, v. 25, n. 5, p. 778–783, 2011.
- SVENDSEN, A. B.; VERPOORTE, R. Chromatography of Alkaloids, Part A: Thin-Layer Chromatography. Elsevier, v. 23, 2011.
- SWANTARA, M. D. et al. Anticancer activities of toxic isolate of *Xestospongia testudinaria* sponge. *Veterinary World*, v. 12, n. 9, p. 1434–1440, 2019.
- TABOADA, S. et al. Antitumoural activity in Antarctic and sub-Antarctic benthic organisms. *Antarctic Science*, v. 22, n. 05, p. 494–507, 2010.
- TAYLOR, R. B. et al. Intraspecific variation in palatability and defensive chemistry of brown seaweeds: effects on herbivore fitness. *Oecologia*, v. 136, n. 3, p. 412–423, 2003.
- TEBBEN, J. et al. Chemical mediation of coral larval settlement by crustose coralline algae. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 10803, 2015.
- TEIXEIRA, T. R. et al. Characterization of the lipid profile of Antarctic brown seaweeds and their endophytic fungi by gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). *Polar Biology*, v. 42, n. 8, p. 1431–1444, 2019.
- THANIGAIVEL, S. et al. Differential solvent extraction of two seaweeds and their efficacy in controlling *Aeromonas salmonicida* infection in *Oreochromis mossambicus*: A novel therapeutic approach. *Aquaculture*, v. 443, p. 56–64, 2015.
- TIBERI, S. et al. Tuberculosis: progress and advances in development of new drugs, treatment regimens, and host-directed therapies. *The Lancet Infectious Diseases*, v. 18, n. 7, p. e183–e198, 2018.

- TOTH, G. B.; PAVIA, H. Induced herbivore resistance in seaweeds: a meta-analysis. *Journal of Ecology*, v. 95, n. 3, p. 425–434, 2007.
- TREIBER. *Quantitative TLC and its Industrial Applications*. CRC Press, 1986.
- UZAIR, B.; MAHMOOD, Z.; TABASSUM, S. Antiviral Activity of Natural Products Extracted from Marine Organisms. *Bioimpacts*, v. 1, n. 4, p. 203-211, 2011.
- VAL, A. et al. Screening of antimicrobial activities in red, green and brown macroalgae from Gran Canaria (Canary Islands, Spain). *International Microbiology*, v. 4, n. 1, p. 35–40, 2001.
- VALDÉS-IGLESIAS, O.; PÉREZ-GIL, R.; COLOM, Y. Actividad antitumoral de los organismos marinos. *Revista electrónica de la Agencia de Medio Ambiente*, v. 10, n. 19, p. 6, 2010.
- VEGA, S. G. DE LA; MERCURI, G. *Antártida: las leyes entre las costas y el mar*. Buenos Aires, Argentina: Contacto Silvestre: Dirección Nacional del Antártico, 2000.
- VENTURA, T. et al. Antimycobacterial and Anti-Inflammatory Activities of Substituted Chalcones Focusing on an Anti-Tuberculosis Dual Treatment Approach. *Molecules*, v. 20, n. 5, p. 8072–8093, 2015.
- VILLARREAL-GÓMEZ, L. J. et al. Antibacterial and anticancer activity of seaweeds and bacteria associated with their surface. *Revista de biología marina y oceanografía*, v. 45, n. 2, 2010.
- WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. CRC Press, 2010.
- WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. CRC Press, 2008.
- WATANABE, K. et al. Two insecticidal monoterpenes, telfairine and aplysiaterpenoid A, from the red alga *Plocamium telfairiae*: Structure elucidation, biological activity, and molecular topographical consideration by a semiempirical molecular orbital study. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 37, n. 3, p. 275–286, 1990.
- WEHRENS, R. *Chemometrics with R*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- WIENCKE, C. et al. Life strategy, ecophysiology and ecology of seaweeds in polar waters. In: AMILS, R.; ELLIS-EVANS, C.; HINGHOFER-SZALKAY, H. (Eds.). *Life in Extreme Environments*. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 213–244, 2007.
- WIENCKE, C. *Biology of Polar Benthic Algae*. Walter de Gruyter, 2011.
- WIENCKE, C.; AMSLER, C. D. Seaweeds and Their Communities in Polar Regions. In: WIENCKE, C.; BISCHOF, K. (Eds.). *Seaweed Biology*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, v. 219 p. 265–291, 2012.
- WIENCKE, C.; AMSLER, C. D.; CLAYTON, M. N. Macroalgae. In: BROYER, C. DE et al. (Eds.). *Biogeographic atlas of the Southern Ocean*. Cambridge: Published by The Scientific Committee on Antarctic Research, Scott Polar research Institute, 2014.

- WIJESINGHE, W. A. J. P.; JEON, Y.-J. Enzyme-assistant extraction (EAE) of bioactive components: A useful approach for recovery of industrially important metabolites from seaweeds: A review. *Fitoterapia*, v. 83, n. 1, p. 6–12, 2012.
- WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal component analysis. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 2, n. 1–3, p. 37–52, 1987.
- ZHANG, Y. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oil of the Whole Plant of *Rungia pectinata*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 19, n. 4, p. 1043–1046, 2016.
- ZIMMER, R. K.; COMMINS, J. E.; BROWNE, K. A. Regulatory effects of environmental chemical signals on search behavior and foraging success. *Ecology*, v. 80, n. 4, p. 1432–1446, 1999.