



Podem as Algas Marinhas Proteger o Nosso Cérebro de Doenças Neurodegenerativas?

SUSANA MICAELA ALVES DOS SANTOS

Outubro de 2022

**Podem as Algas Marinhas Proteger o Nosso
Cérebro de Doenças Neurodegenerativas? Avaliação *in
vitro* e *in vivo* da capacidade neuroprotetora de extratos
de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar**



Susana Micaela Alves dos Santos

Mestrado em Biorrecursos

2021/2022

**Podem as Algas Marinhas Proteger o Nosso Cérebro de Doenças
Neurodegenerativas? Avaliação *in vitro* e *in vivo* da capacidade
neuroprotetora de extratos de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar**

Autor:

Susana Micaela Alves dos Santos

Orientadores:

Doutora Clara Grosso | REQUIMTE/LAQV

Doutora Cristina Soares | REQUIMTE/LAQV

Professora Doutora Cristina Delerue-Matos | REQUIMTE/LAQV



Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ) - Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV) da REQUIMTE

Instituto Superior de Engenharia do Instituto Politécnico do Porto

Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR)

Dissertação Submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biorrecursos

Outubro 2022

Agradecimentos

Agradeço o apoio e a orientação que me foi prestado não teria sido possível a realização desta dissertação de mestrado e por isso sou grata.

À minha orientadora Professora Doutora Cristina Delerue-Matos pela sugestão e confiança na atribuição do tema desta dissertação de mestrado.

Às minhas orientadoras Dr. Clara Grosso e Dr. Cristina Soares que me orientaram no desenvolvimento deste trabalho tanto a nível prático como a nível teórico, pelo facto de me incentivarem a ultrapassar as dificuldades para a conquista de um bom trabalho.

Ao CIIMAR, principalmente à Doutora Laura Guimarães e ao Pedro Rodrigues, que me integraram no seu grupo de investigação METOX e orientaram todo o meu trabalho a nível dos ensaios *in vivo*, em que a ajuda de ambos foi imprescindível para a aprendizagem sobre o tema dos ensaios nos organismos peixe-zebra.

Por fim quero agradecer a toda a minha família pelo apoio, incentivo e ajuda na superação dos obstáculos que foram surgindo.

Esta tese foi desenvolvida no âmbito do projeto PTDC/OCE-ETA/30240/2017 – SilverBrain – Do mar para o cérebro: Extratos verdes neuroprotetores para nanoencapsulamento e produção de alimentos funcionais, financiado pela União Europeia e Fundação para a Ciência e a Tecnologia ((POCI-01-0145-FEDER-030240)).

Resumo

O aumento da esperança média de vida e do número de casos de pessoas com doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas tem levado a que haja uma intensificação da preocupação mundial na investigação das causas e dos possíveis tratamentos para doenças como a doença do Alzheimer (DA), a doença de Parkinson (DP) ou de doenças neuropsiquiátricas, como a depressão, de modo a melhorar o nível de vida da população afetada. As algas marinhas como a *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar têm sido alvo de vários estudos de investigação devido à presença de compostos naturais com capacidade neuroprotetora contra doenças neurodegenerativas.

Assim sendo, o objetivo deste estudo foi testar a bioatividade de extratos da alga marinha *U. pinnatifida*, recorrendo a ensaios *in vitro* e *in vivo*, para determinar as suas propriedades antioxidantes e a sua capacidade de inibição de enzimas do sistema nervoso central (SNC), de modo a avaliar a sua influência no tratamento e prevenção de doenças neurodegenerativas como DA, DP ou de doenças neuropsiquiátricas, como a depressão. As análises *in vivo* foram realizadas após os ensaios *in vitro*, de modo a estudar a influência dos extratos no desenvolvimento embrionário dos peixes zebra. Os extratos foram obtidos através da extração assistida por microondas (MAE) após otimização dos parâmetros de extração. Esta otimização foi realizada com base em várias extrações convencionais realizadas com diferentes condições de extração.

Como principais resultados *in vitro*, verificou-se que o extrato de *U. pinnatifida*, obtido pela extração MAE com a mistura de solventes água: etanol (50:50 v/v) a 40 °C durante 30 min e com uma razão sólido solvente de 1:40 (g:mL), com TPC = $7,39 \pm 1,33$ mg GAE/g extrato seco, clorofila *a* = $0,90 \pm 0,13$ mg/g extrato seco, clorofila *c* = $0,21 \pm 0,040$ mg/g extrato seco, clorofilas totais = $1,21 \pm 0,19$ mg/g extrato seco e carotenoides = $0,26 \pm 0,044$ mg/g extrato seco, apresentou atividade antioxidante em termos de sequestro dos radicais DPPH[•], ABTS^{•+}, [•]NO, O₂^{•-} e [•]OH com percentagens de sequestro máxima respetivamente, de $59,4 \pm 3,5$ % (2,78 mg/mL), $93,7 \pm 2,4$ % (5,0 mg/mL), $57,5 \pm 1,5$ % (2,0 mg/mL), $34,4 \pm 0,11$ % (2,0 mg/mL) e $39,2 \pm 0,95$ % (4,0 mg/mL). Em termos da inibição das enzimas do SNC, o extrato apresentou baixa capacidade de inibição enzimática, sendo que para a enzima acetilcolinesterase (AChE) apresentou uma inibição máxima de $33,3 \pm 6,3$ % (4,0 mg/mL), em relação à butirilcolinesterase (BuChE) uma inibição de $33,0 \pm 3,3$ % (4,0 mg/mL) e por fim em relação à tirosinase apresentou uma inibição de $55,5 \pm 2,3$ % (4,0 mg/mL).

Os resultados *in vivo* relativos à avaliação do desenvolvimento do peixe-zebra exposto ao mesmo extrato de *U. pinnatifida*, revelaram que o mesmo não apresentou efeitos negativos significativos nas taxas de eclosão dos embriões expostos. No entanto, para as mesmas concentrações testadas, observou-se uma diminuição no comprimento total das larvas eclodidas com valores significativos para as concentrações de extrato mais altas 10×10^3 (6,2 %), 50×10^3 (5,4 %) e 100×10^3 (5,7 %) µg/L. Para além disso, a concentração de extrato mais alta (100×10^3 µg/L) foi também responsável pelo aparecimento significativo de malformações a nível dos olhos, pigmentação e a nível da posição lateral da larva às 96 hpf. No futuro seria interessante avaliar também a bioatividade dos extratos de *U. pinnatifida* nos peixe-zebra para determinar se os resultados são semelhantes ou melhores do que os obtidos *in vitro*. No entanto, caso se mantivessem os valores de IC₅₀ observados nos ensaios *in vitro* poderia existir toxicidade, pois teriam de ser usadas concentrações mais elevadas do que 100×10^3 µg/L.

Concluiu-se que o extrato de *U. pinnatifida* utilizado apresentou moderada atividade antioxidante e inibitória da tirosinase em ensaios *in vitro*, podendo apresentar efeitos benéficos moderados no tratamento da DA e DP. No entanto, estudos *in vivo* serão cruciais para averiguar as potencialidades deste extrato.

Palavras-Chave: Doenças neurodegenerativas, neuroinflamação, stress oxidativo, *U. pinnatifida*, propriedades antioxidantes e neuroprotetoras, peixe-zebra

Abstract

The increase in the average life expectancy and the number of cases of people with neurodegenerative and neuropsychiatric diseases has led to an intensification of worldwide concern in researching the causes and possible treatments for diseases such as Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) or neuropsychiatric diseases such as depression, to improve the standard of living of the affected population. Seaweeds such as *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar have been the subject of several research studies due to the presence of natural compounds with neuroprotective ability against neurodegenerative diseases.

Therefore, the aim of this study was to test the bioactivity of *U. pinnatifida* seaweed extracts, using *in vitro* and *in vivo* assays, to determine their antioxidant properties and their ability to inhibit central nervous system (CNS) enzymes, in order to evaluate their influence in the treatment and prevention of neurodegenerative diseases such as AD, PD or neuropsychiatric diseases such as depression. *In vivo* analyses were performed after the *in vitro* assays, to study the influence of the extracts on the embryonic development of zebrafish. The extracts were obtained by microwave assisted extraction (MAE) after optimization of the extraction parameters. This optimization was performed based on several conventional extractions carried out with different extraction conditions.

For *in vitro* studies, it was found that the extract of *U. pinnatifida*, obtained by MAE extraction with the solvent mixture water: ethanol (50:50 v/v) at 40 °C for 30 min and with a solid/solvent ratio of 1:40 (g: mL), with TPC = 7.39 ± 1.33 mg GAE/g dry extract, chlorophyll *a* = 0.90 ± 0.13 mg/g dry extract, chlorophyll *c* = 0.21 ± 0.040 mg/g dry extract, total chlorophyll = 1.21 ± 0.19 mg/g dry extract and carotenoids = 0.26 ± 0.044 mg/g dry extract, showed antioxidant activity in terms of scavenging of the DPPH[•], ABTS^{•+}, [•]NO, O₂^{•-} and [•]OH radicals with a maximum scavenging percentage, respectively of, 59.4 ± 3.5 % (2.78 mg/mL), 93.7 ± 2.4 % (5.0 mg/mL), 57.5 ± 1.5 % (2.0 mg/mL), 34.4 ± 0.11 % (2.0 mg/mL) and 39.2 ± 0.95 % (4.0 mg/mL). In terms of CNS enzymes inhibition, the extract showed low enzyme inhibition capacity, and for the enzyme acetylcholinesterase (AChE) it showed a maximum inhibition of 33.3 ± 6.3 % (4.0 mg/mL), for butyrylcholinesterase (BuChE) a maximum inhibition of 33.0 ± 3.3 % (4.0 mg/mL) and finally for tyrosinase a maximum inhibition of 55.5 ± 2.3 % (4.0 mg/mL).

The *in vivo* results concerning the evaluation of the development of zebra fish exposed to the same *U. pinnatifida* extract, revealed that it did not show significant negative effects on the hatching rates of the exposed embryos. However, for the same concentrations tested, a decrease in the total length of hatched larvae was observed with significant values for the highest extract concentrations 10×10^3 (6.2 %), 50×10^3 (5.4 %) and 100×10^3 (5.7 %) µg/L. Furthermore, the highest extract concentration (100×10^3 µg/L) was also responsible for the significant appearance of eye, pigmentation, and lateral position malformations of the larvae at 96 hpf. In the future, it would be interesting to evaluate the bioactivity of the *U. pinnatifida* extracts in zebrafish and compare it to *in vitro* studies, however, considering the *in vitro* IC₅₀ values, toxicity could exist, since for the existence of bioactivity (IC₅₀) higher concentrations would have to be used than those that proved to cause toxicity in zebrafish.

In conclusion, this study demonstrated that *U. pinnatifida* extract showed moderate antioxidant and tyrosinase inhibitory activity, and may present moderate beneficial effects in the treatment of AD and PD. However, *in vivo* studies will be crucial to ascertain the potentialities of this extract.

Keywords: Neurodegenerative diseases, neuroinflammation, oxidative stress, *U. pinnatifida*, antioxidant and neuroprotective properties, zebrafish

Índice

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	v
Abstract	vi
Índice.....	viii
Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas.....	xvi
Lista de Abreviaturas.....	xviii
Capítulo 1 – Introdução	1
1.1. Enquadramento.....	1
1.2. Apresentação dos Laboratórios	1
1.3. Tema e objetivos da dissertação	2
1.4. Organização da dissertação	3
Capítulo 2 – Doenças Neurodegenerativas.....	5
2.1. Doença de Alzheimer	10
2.2. Doença de Parkinson	13
2.3. Depressão	14
2.4. Tratamento e Prevenção com Algas Marinhas	16
2.4.1. Alga marinha <i>Undaria pinnatifida</i>	16
2.4.1.1. Fucoxantina	18
2.4.1.2. Fucoidano	19
2.4.1.3. Fucosterol	20
2.4.1.4. Glicoproteínas.....	21
2.4.1.5. Compostos Fenólicos – Florotaninos.....	21
2.4.2. Extração e purificação dos compostos bioativos	22
2.4.2.1. Extração Assistida por Micro-ondas.....	25
2.4.3. Identificação e quantificação espectral	27
2.4.4. Ensaio <i>in vitro</i> dos extratos obtidos	28
2.4.4.1. Avaliação da atividade antioxidante	28
2.4.4.2. Avaliação da atividade enzimática	29
2.4.5. Ensaio <i>in vivo</i> dos extratos obtidos em embriões de peixe-zebra	29
Capítulo 3 – Descrição das atividades desenvolvidas: Metodologia.....	39
3.1. Reagentes e Materiais.....	39
3.2. Preparação das amostras.....	39
3.2. Extração dos compostos bioativos antioxidantes	39
3.2.1. Extrações Convencionais.....	40

3.2.2.	Extração Assistida por Micro-ondas (MAE)	40
3.3.	Ensaio <i>in vitro</i> : Avaliação da atividade antioxidante.....	41
3.3.1.	Quantificação do Conteúdo Fenólico Total (TPC).....	41
3.3.2.	Quantificação do conteúdo de carotenoides totais e clorofilas a, c e totais	42
3.3.3.	Quantificação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH*	43
3.3.4.	Quantificação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS ^{•+}	44
3.3.5.	Avaliação do sequestro do radical óxido nítrico (*NO)	46
3.3.6.	Avaliação do sequestro do radical superóxido (O ₂ ^{•-}).....	48
3.3.7.	Avaliação do sequestro do radical hidroxilo (*OH)	50
3.4.	Ensaio <i>in vitro</i> : Avaliação da atividade enzimática	52
3.4.1.	Quantificação da atividade inibitória das enzimas AChE e BuChE.....	52
3.4.2.	Quantificação da atividade inibitória da enzima Tirosinase	55
3.5.	Ensaio <i>in vivo</i> dos extratos obtidos em embriões e larvas de peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>)	57
3.5.1.	Avaliação do desenvolvimento embrionário do peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) pela ação do extrato de <i>U. pinnatifida</i>	57
3.6.	Análise Estatística dos Resultados	59
Capítulo 4 – Resultados e Discussão.....		61
4.1.	Extrações Convencionais.....	61
4.1.1.	Rendimento das Extrações.....	61
4.1.2.	Conteúdo fenólico total (TPC)	62
4.1.3.	Conteúdo de carotenoides e clorofilas.....	65
4.1.3.1.	Conteúdo de Clorofila <i>a</i>	65
4.1.3.2.	Conteúdo de Clorofila <i>c</i>	67
4.1.3.3.	Conteúdo de Clorofilas Totais	71
4.1.3.4.	Conteúdo de Carotenoides.....	73
4.2.	Seleção das Condições Ótimas de Extração – Extrações Convencionais vs MAE ...	77
4.2.1.	Rendimento das Extrações Convencionais vs MAE	77
4.2.2.	TPC das Extrações Convencionais vs MAE.....	79
4.2.3.	Conteúdo de Carotenoides e Clorofilas das Extrações Convencionais vs MAE. 80	
4.3.	Ensaio <i>in vitro</i> : Avaliação da Atividade Antioxidante do extrato de <i>U. pinnatifida</i> 83	
4.4.	Ensaio <i>in vitro</i> : Avaliação da Atividade Enzimática do extrato de <i>U. pinnatifida</i> .. 86	
4.5.	Ensaio <i>in vivo</i> : Avaliação do desenvolvimento do peixe-zebra pela ação do extrato de <i>U. pinnatifida</i>	89
Capítulo 5 – Conclusões.....		94
Referências Bibliográficas.....		96

Índice de Figuras

Figura 1. Relação entre a neuroinflamação e o stress oxidativo em doenças neurodegenerativas como DA e DP. Adaptado de (Pereira & Valado, 2021).....	7
Figura 2. Mecanismo de biossíntese de neuromelanina (Eisenhofer et al., 2003).....	10
Figura 3. Representação esquemática dos danos que a acumulação de A β causam no desenvolvimento de DA. Adaptado de (Tamagno et al., 2021).	11
Figura 4. Reação de conversão da ACh pela AChE em Ch (Araújo et al., 2016).	12
Figura 5. Representação esquemática do funcionamento geral da transmissão dos impulsos nervosos nos neurónios (Petronilho et al., 2011).	12
Figura 6. Funcionamento da transmissão do impulso nervoso de forma normal com ACh e AChE (A), e quando ocorre a ação de um inibidor de AChE (IAChE) (B) (Araújo et al., 2016).....	13
Figura 7. Processos fisiológicos relacionados com a degeneração dos neurónios dopaminérgicos e conseqüentemente o aparecimento da DP. Legenda: DJ-1, SNCA, UCH-L1, Parkin PINK-1 – genes causadores da DP; UPS- proteossoma. Adaptado de (Wei et al., 2018).	14
Figura 8. Esquema representativo da relação entre o stress oxidativo e o risco do desenvolvimento da depressão. Legenda: (A) Representação da fisiologia da mitocôndria; (B) Produção de grandes quantidades de ROS e RNS juntamente com ATP; (C) Aumento da vulnerabilidade da mitocôndria; (D) Aumento da vulnerabilidade do cérebro; (E) Danos oxidativos; (F) Falha na capacidade antioxidante para equilibrar a produção de ROS/RNS e desenvolvimento do stress oxidativo. (G) Mau funcionamento das mitocôndrias. AO, antioxidantes; PO, pró-oxidantes. Adaptado de (Caruso et al., 2019).....	15
Figura 9. Alga marinha <i>Undaria pinnatifida</i> (Esler, 2015).....	17
Figura 10. Compostos bioativos com atividades neuroprotetoras presentes nas algas marinhas e o seu foco de ação. Adaptado de (Schepers et al., 2020).	18
Figura 11. Estrutura molecular do carotenoide fucoxantina (H. Zhang et al., 2015).	18
Figura 12. Estrutura molecular do polissacarídeo sulfatado fucoídano (Koh et al., 2019).	19
Figura 13. Estrutura molecular do esteroide fucosterol (Zhen et al., 2015).	20
Figura 14. Comparação entre o aquecimento convencional (a) e o aquecimento por micro-ondas (b). Adaptado de (Titton, 2018).....	26
Figura 15. Peixe-zebra (<i>Danio rerio</i>) e os seus embriões e larvas (CIIMAR, 2017).....	30
Figura 16. Estágios de desenvolvimento embrionário do peixe-zebra desde o estágio 1 célula (0,2 hpf) até às 72 hpf. Adaptado de (Kimmel et al., 1995).....	31
Figura 17. Desenvolvimento embrionário do peixe-zebra às 96 hpf, em posição lateral (side-wise position) (A) e em posição natatória (B). Adaptado de (Kimmel et al., 1995).	33

Figura 18. Representação esquemática da microplaca usada para a determinação do TPC. Legenda: A1-A3: brancos; A4-B9: padrões em triplicado com as respetivas concentrações (200, 150, 100, 50, 25 e 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$); B10-H9: amostras em triplicado desde a mais concentrada à mais diluída. 42

Figura 19. Representação esquemática da microplaca usada para o bioensaio de sequestro do radical DPPH \cdot . Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra – etanol a substituir a amostra), Linhas A-E: Amostra mais concentrada à menos concentrada (2,78; 1,39; 0,556; 0,278; 0,0556 mg/mL no poço). As colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco e não contêm o DPPH \cdot , apenas contêm 25 μL de amostra e 200 μL de etanol. 44

Figura 20. Representação esquemática da microplaca usada para o bioensaio de sequestro do radical ABTS $^{+\cdot}$. Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra – etanol a substituir a amostra), Linhas A-E: Amostra mais concentrada à menos concentrada (5,0; 2,5; 1,0; 0,50; 0,10 mg/mL no poço). As colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco da amostra e não contêm o ABTS $^{+\cdot}$, apenas contêm 20 μL de amostra e 180 μL de etanol. 45

Figura 21. Reação de Griess (Filipe & Gonçalves, 2012). 46

Figura 22. Representação esquemática das diluições em série realizadas para os extratos de *U. pinnatifida* obtidos da extração com água: etanol (50:50, v/v), no qual a concentração da solução stock do extrato apresentava uma concentração de 6,0 mg/mL. 47

Figura 23. Representação esquemática da microplaca usada para o ensaio de sequestro do radical $\cdot\text{NO}$. Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra), Linhas A-G: Amostra mais concentrada à menos concentrada (2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12; 0,062 e 0,031 mg/mL). As colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco e não contêm o reagente de Griess. 48

Figura 24. Reação de redução do PMS pelo NADH, e formação do formazano quantificável a 560 nm (Filipe & Gonçalves, 2012). 49

Figura 25. Representação esquemática das diluições em série realizadas para os extratos de *U. pinnatifida* obtidos da extração com água: etanol (50:50, v/v), no qual a concentração da solução stock do extrato apresentava uma concentração de 12 mg/mL. 49

Figura 26. Representação esquemática da microplaca usada para o ensaio de sequestro do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$. Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra), Linhas A-G: Amostra mais concentrada à menos concentrada (2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12; 0,062 e 0,031 mg/mL). As colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco e não contêm o PMS. 50

Figura 27. Reações de ligação do radical $\cdot\text{OH}$ ao ácido salicílico. Adaptado de (Panchompoo et al., 2012). 51

Figura 28. Representação esquemática das diluições em série realizadas para os extratos de *U. pinnatifida* obtidos da extração com água: etanol (50:50, v/v), no qual a concentração da solução stock do extrato apresentava uma concentração de 16 mg/mL. 51

Figura 29. Representação esquemática da microplaca usada para o ensaio de sequestro do radical $\cdot\text{OH}$. Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra), Linhas A-G: Amostra mais concentrada à menos concentrada (4,0; 2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12 e 0,062 mg/mL). As colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco e não contêm o peróxido de hidrogénio. 52

Figura 30. Reação de Ellman para a determinação da inibição da enzima AChE. Adaptado de (Matějovský & Pitschmann, 2018).....	53
Figura 31. Reação de Ellman para a determinação da inibição da enzima BuChE. Adaptado de (Zeman et al., 2017)	53
Figura 32. Representação esquemática das diluições em série realizadas para o extrato de <i>U. pinnatifida</i> , no qual a concentração da solução stock do extrato apresentava uma concentração de 20 mg/mL.....	54
Figura 33. Representação esquemática da microplaca usada para o bioensaio de inibição da AChE e BuChE. Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra), Linhas A-G: Amostra mais concentrada à menos concentrada (2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12; 0,062 e 0,031 mg/mL). As colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco e não contém enzima.	55
Figura 34. Representação esquemática das diluições em série realizadas para o extrato de <i>U. pinnatifida</i> , no qual a solução stock de extrato concentrado apresentava uma concentração de 10 mg/mL.	56
Figura 35. Representação esquemática da microplaca usada para o bioensaio de inibição da tirosinase. Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra), Linhas A-G: Amostra mais concentrada à menos concentrada (4,0; 2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12 e 0,062. Colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco e não contém L-DOPA.	56
Figura 36. Metodologia de determinação do tamanho das larvas de peixe-zebra, pela utilização do programa ImageJ.	59
Figura 37. Rendimentos (%) obtidos para as extrações convencionais realizadas nas razões sólido: solvente de 1:10 e 1:20 g/mL a 25 °C (A) e 40°C (B) durante 1h e nas mesmas condições durante 2h (C e D), respetivamente.....	61
Figura 38. Comparação dos resultados TPC (mg/g de extrato seco) em relação às razões (1:10 e 1:20 g:mL) para as extrações convencionais com duração de 1h (A) e 2h (B) a 25 °C, e 1h (C) e 2h (D) a 40 °C, juntamente com a comparação dos resultados TPC (mg/g de extrato seco) em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extrações com duração de 1h nas razões de 1:10 (E) e 1:20 (F) g:mL.	63
Figura 39. Comparação dos resultados do teor de clorofila a (mg/g de extrato seco), em relação às razões (1:10 e 1:20 g:mL) para as extrações convencionais com duração de 1h (A) e 2h (B) a 25 °C, e 1h (C) e 2h (D) a 40 °C, juntamente com a comparação dos resultados do conteúdo de clorofila a (mg/g de extrato seco) em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extrações com duração de 1h nas razões de 1:10 (E) e 1:20 (F) g:mL.	66
Figura 40. Comparação dos resultados do conteúdo de clorofila c (mg/g de extrato seco), em relação às razões sólido: solvente (1:10 e 1:20 g:mL) para as extrações convencionais com duração de 1h (A) e 2h (B) a 25 °C, e 1h (C) e 2h (D) a 40 °C, juntamente com a comparação dos resultados do teor de clorofila c (mg/g de extrato seco) em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extrações com duração de 1h nas razões de 1:10 (E) e 1:20 (F) g:mL.....	69

Figura 41. Comparação dos resultados do conteúdo de clorofilas totais (mg/g de extrato seco), em relação às razões (1:10 e 1:20 g:ml) para as extracções convencionais com duração de 1h (A) e 2h (B) a 25 °C, e 1h (C) e 2h (D) a 40 °C, juntamente com a comparação dos resultados do teor de clorofilas totais (mg/g de extrato seco) em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extracções com duração de 1h nas razões de 1:10 (E) e 1:20 (F) g:mL. 72

Figura 42. Comparação dos resultados do conteúdo de carotenoides (mg/g de extrato seco), em relação às razões (1:10 e 1:20 g:mL) para as extracções convencionais com duração de 1h (A) e 2h (B) a 25 °C, e 1h (C) e 2h (D) a 40 °C, juntamente com a comparação dos resultados do teor de carotenoides (mg/g de extrato seco) em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extracções com duração de 1h nas razões de 1:10 (E) e 1:20 (F)..... 75

Figura 43. Comparação dos rendimentos obtidos (%) entre as extracções convencionais (E.Conv.) e extracções assistidas por micro-ondas (MAE) com os solventes água: acetona e água: etanol na razão sólido: solvente de 1:40 g:mL, temperatura de 40 °C e tempos de extracção de 1h (E.Conv.) e 30 min (MAE). 78

Figura 44. Comparação dos resultados TPC (mg GAE/g extrato seco) entre as extracções convencionais (E.Conv.) e extracções assistidas por micro-ondas (MAE) com os solventes água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v) na razão sólido: solvente de 1:40 g:mL, temperatura de 40 °C e tempos de extracção de 1h (E.Conv.) e 30 min (MAE). 79

Figura 45. Comparação dos resultados do conteúdo de clorofila a (A), clorofila c (B), clorofilas totais (C) e carotenoides (D) (mg /g extrato seco) entre as extracções convencionais (E.Conv.) e extracções assistidas por micro-ondas (MAE) com os solventes água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v) na razão sólido: solvente de 1:40 g:mL, temperatura de 40 °C e tempos de extracção de 1h (E.Conv.) e 30 min (MAE). 80

Figura 46. Curvas dose-resposta relativamente ao sequestro dos radicais DPPH[•](A), ABTS^{•+}(B), [•]NO (C), O₂^{•-}(D) e [•]OH (E), em função das concentrações do extrato de *U. pinnatifida* de modo a avaliar a atividade antioxidante do extrato..... 84

Figura 47. Inibição das enzimas AChE, BuChE e tirosinase em função das concentrações do extrato de *U. pinnatifida*. 87

Figura 48. Frequência acumulada de malformações observadas no controlo negativo, controlo com solvente e nos embriões/larvas expostos a diferentes concentrações do extrato de *U. pinnatifida* testado às 48 e 96 hpf. Legenda: O símbolo * - indica que existem diferenças estatísticas (p<0.05) em relação ao controlo solvente. 90

Figura 49. Taxa de eclosão (%) dos embriões de peixe-zebra avaliada às 48, 72 e 96 hpf, para os controlos (negativo e com solvente) e para as concentrações de extrato de *U. pinnatifida* utilizadas 91

Figura 50. Comprimento total das larvas de peixe-zebra expostas durante 96 hpf às diferentes concentrações do extrato de *U. pinnatifida* (0,1; 1; 10; 100; 1×10³; 10×10³; 50×10³ e 100×10³µg/L), e o comprimento total das larvas do controlo negativo e do controlo com solvente. Legenda: *diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo com solvente a p<0.05; **diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo com solvente a p<0.01. 91

Índice de Tabelas

Tabela 1. Exemplos de alguns métodos de extração não convencionais juntamente com as suas vantagens e desvantagens em relação aos métodos convencionais (Lourenço-Lopes et al., 2020; Matos et al., 2021; Meregalli, 2017).	23
Tabela 2. Métodos de extração, separação e identificação dos compostos neuroprotetores (fucoxantina, fucoidano, fucosterol e glicoproteínas) presentes na alga marinha <i>U. pinnatifida</i>	25
Tabela 3. Exemplos de alguns modelos ou testes utilizados para a avaliação comportamental dos peixes-zebra e ratos ou roedores, para o estudo de doenças neurodegenerativas.	33
Tabela 4. Exemplos de alguns modelos genéticos dos peixes-zebra e ratos ou roedores, para o estudo de doenças neurodegenerativas.	35
Tabela 5. Condições usadas para a MAE, para o tempo de 30 min, razão sólido:solvente de 1:40 g:mL, e temperaturas de 40 °C, para 14 vasos de extração.	41
Tabela 6. Observações do desenvolvimento embrionário do peixe-zebra realizadas para os diferentes períodos de exposição (24, 48, 72 e 96 hpf).	58

Lista de Abreviaturas

5-HT	Serotonina
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfónico
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AMPA	alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
APP (V717F) fenilalanina no codão 717	Mutação da proteína β -amiloide pela substituição da valina pela
ATCI	Iodeto de acetilcolina
ATP	Adenosina trifosfato
A β	β -amiloide
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
BTCI	Iodeto de butirilticolina
BuChE	Butirilcolinesterase
Ch	Colina
DA	Doença do Alzheimer
DH	Doença de Huntington
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Doença do Parkinson
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (reagente de Ellman)
ELA	Esclerose lateral amiotrófica
EMA	Agência Europeia de Medicamentos, do inglês "European Medicines Agency"
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos do inglês "Food and Drug Administration"
FRAP	Poder antioxidante redutor de iões férricos, do inglês "Ferric ion reducing xviiiime txviiiuraxviiiio power"
FTLD MAPT P301L	Demência causada pela mutação P301L (substituição da prolina pela leucina no codão 301) no gene MAPT da proteína tau associada ao microtúbulo
GABA	Ácido gama aminobutírico
GAE	Equivalentes de ácido gálico do inglês "Gallic acid xviiiime txviiiuraxviiiio"

GSH		Glutathiona reduzida
Hpf		Horas pós-fertilização
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês “High-performance liquid chromatography”	
HPLC-DAD de díodos		Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de matriz
HPLC-UV		Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de UV
ICH	Concelho Internacional para a Harmonização, do inglês “International Council for Harmonisation”	
L-DOPA		Levodopa
MAE	Extração assistida por microondas, do inglês “Microwave-assisted extraction”	
NADH		Dinucleótido de nicotinamida e adenina
NBT		Azul de nitrotetrazólio
NMDA		N-metil-D-aspartato
NOS		Óxido nítrico sintetase
ONU		Organização das Nações Unidas
PLE	Extração com líquidos pressurizados, do inglês “ Pressurized liquid extraction”	
PMS		Metossulfato de fenazina
PTFE		Politetrafluoretileno
RNS		Espécies reativas de nitrogénio
ROS		Espécies reativas de oxigénio
SEC	Cromatografia de exclusão de tamanho, do inglês “Size-exclusion chromatography”	
SFE	Extração com fluídos supercríticos, do inglês “Supercritical fluid extraction”	
SNC		Sistema nervoso central
SNP		Nitroprussiato de sódio
SOD		Superóxido dismutase
Tau A152T	Mutação pela substituição da alanina pela treonina no codão 152 da proteína tau	
Tau P301L	Mutação pela substituição da prolina pela leucina no codão 301 da proteína tau	
TEAC		Capacidade Antioxidante em equivalentes de Trolox, do inglês “Trolox xixime txixuraxix xixime txixuraxixo capacity”
Thy1.2		Gene promotor de uma glicoproteína de membrana
TNB		5,5’-ditiobis-2-nitrobenzoato

TPC	Conteúdo fenólico total, do inglês “Total phenolic content”
Tph1	Gene promotor da triptofano hidroxilase 1
Tph2	Gene promotor da triptofano hidroxilase 2
UAE	Extração assistida por ultrassons, do inglês “Ultrasound-assisted extraction”

Capítulo 1 – Introdução

1.1. Enquadramento

Os ensaios *in vitro* da presente tese de mestrado foi desenvolvida no Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ) localizado no campus do Instituto Superior de Engenharia do Porto (ISEP) – na Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 431, 4200-072 Porto. Este grupo de investigação é membro do Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV), uma das unidades de investigação da REQUIMTE (Rede de Química e Tecnologia). Os ensaios *in vivo* foram realizados nas instalações do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), localizado no Terminal de Cruzeiros do Porto de Leixões, Matosinhos.

A tese foi desenvolvida durante o último ano do mestrado em Biorrecursos como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biorrecursos.

1.2. Apresentação dos Laboratórios

O Laboratório Associado para a Química Verde (LAQV) pertence à Rede de Química e Tecnologia (REQUIMTE) que foi criada por investigadores da Universidade do Porto e da Universidade NOVA de Lisboa, no ano de 1996. Lisboa e Porto são as duas principais áreas metropolitanas nacionais no qual este grupo se encontra configurado, mas tem vindo a abranger outras regiões de norte a sul de Portugal, tais como Aveiro, Évora, Coimbra e outras pequenas áreas.

O objetivo do LAQV é encontrar e fornecer soluções mais sustentáveis para as indústrias, governos e público em geral, alargando os limites das Química Sustentável e da Engenharia Química. Este grupo é compreendido por 1088 investigadores, 484 investigadores doutorados, que desenvolvem a sua investigação na área da Síntese e Catálise Química, Ciência e tecnologia alimentar, Produtos Naturais, Química Analítica, Intensificação de Processos e Tecnologias Limpas, Solventes Alternativos, e Materiais Inteligentes.

O LAQV tem como objetivos específicos:

- Aumentar o impacto internacional da investigação em Química Sustentável;
- Assegurar que mais resultados da investigação conduzam a resultados económicos e sociais, através da cooperação com parceiros industriais e da criação de spin-offs;
- Atrair jovens investigadores para serem formados nos múltiplos tópicos de apoio à Química Sustentável;
- Procurar parceiros industriais centrados na implementação de tecnologias e processos limpos;
- Aconselhar os decisores na tomada de decisões sobre questões de saúde e segurança relacionadas com produtos ou processos (bio)químicos, através de uma maior colaboração com organismos reguladores;
- Partilhar os princípios da Química Sustentável e os resultados da investigação com o público em geral, governos e indústria

Como visão, o LAQV pretende contribuir para um desenvolvimento sustentável a nível mundial, no qual a Química Sustentável possa ser utilizada como uma ferramenta poderosa e dinâmica para contribuir para enfrentar os desafios atuais e futuros, a nível social, económico e ambiental.

O LAQV inicia, avança e promove os princípios da Química Sustentável através de várias atividades de investigação, trabalho em rede, formação e divulgação. Por isso alinha temas a partir da Agenda de Investigação da Plataforma Europeia para a Química Sustentável, da Agenda das Nações Unidas (ONU) para o Desenvolvimento Sustentável e as prioridades do Horizonte 2020 e Horizonte Europa.

O LAQV está dividido em vários grupos de investigação. O presente tema de dissertação de mestrado foi proposto pelo grupo de Química Ambiental coordenado pela Professora Doutora Cristina Delerue-Matos. Este grupo foca a sua investigação nos seguintes tópicos: poluentes minerais, orgânicos, e xenobióticos na água, solo, sedimentos, ar, organismos e alimentos, o seu impacto na qualidade ambiental, saúde humana e segurança alimentar; e a sua origem, destino, biodegradação, e transporte no ambiente. Este grupo também desenvolve estudos na área da toxicologia ambiental, microbiologia, química, engenharia e avaliação de perigo/risco; controlo e remediação de solos; monitorização e tratamento de água e resíduos sólidos municipais e industriais, bem como de substâncias tóxicas e perigosas. A química analítica é uma área importante nestes estudos, com o desenvolvimento e validação de métodos de rastreio e/ou a melhoria dos métodos já existentes para a análise de contaminantes, com base nos princípios da Química Verde, e da sustentabilidade ambiental e económica.

O CIIMAR promove uma abordagem integrada na investigação dos oceanos e zonas costeiras com o objetivo de promover a compreensão do conhecimento do comportamento biológico, físico e químico destes ambientes, avaliando simultaneamente o impacto que as ações humanas e naturais apresentam sobre os mesmos. Com esta abordagem tenta compreender o funcionamento dos oceanos e dos seus ecossistemas e tenta dar resposta às mudanças globais.

Nestas instalações são promovidas abordagens baseadas no conhecimento, na promoção do capital natural e na gestão sustentável dos recursos marinhos, no qual ocorre a monitorização da saúde dos ecossistemas, a otimização da aquacultura e a exploração biotecnológica dos recursos com vista a aplicações ambientais e na saúde humana.

Para além disso, o CIIMAR fornece soluções e produtos inovadores de forma a dar resposta aos desafios económicos e sociais atuais, como por exemplo a procura de novos medicamentos, produtos marinhos para satisfazer as necessidades industriais e medicinais, qualidade de vida, pesca sustentável, preparação e mitigação de derrames de petróleo e/ou outros contaminantes emergentes, monitorização ambiental e avaliação de risco, preservação dos ecossistemas, preservação dos serviços dos ecossistemas, gestão dos oceanos e da costa, e ensinamentos sobre os oceanos e os seus ecossistemas.

1.3. Tema e objetivos da dissertação

O tema proposto para a realização da tese de mestrado foi “Podem as algas marinhas combater as doenças neurodegenerativas? Avaliação *in vitro* e *in vivo* da capacidade neuroprotetora de extratos de *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar”, no qual o objetivo vai ser estudar a bioatividade de extratos da alga marinha *U. pinnatifida* a nível das suas propriedades antioxidantes e na inibição de enzimas do sistema nervoso central (SNC), de modo a avaliar a sua influência no tratamento e prevenção de doenças neurodegenerativas como a doença do Alzheimer (DA), a doença de Parkinson (DP) ou de doenças neuropsiquiátricas, como a depressão. Seguidamente, estudar-se-á a influencia dos extratos no desenvolvimento e comportamento de embriões peixe-zebra.

1.4. Organização da dissertação

Este relatório está dividido em diversos capítulos sendo que o primeiro é dedicado a uma parte introdutória sobre o enquadramento e apresentação do grupo de investigação, a apresentação do tema e dos objetivos do estágio. O segundo capítulo é dedicado essencialmente à explicação da parte teórica associada ao tema e ao trabalho desenvolvido, no qual é feita uma explicação sobre as doenças neurodegenerativas e algumas das suas possíveis causas e estudo de possíveis tratamentos ou formas de prevenção através da utilização das propriedades bioativas da alga marinha *U. pinnatifida*. As metodologias usadas para a realização da parte prática encontram-se no terceiro capítulo. A apresentação e discussão dos resultados obtidos é apresentada no quarto capítulo e as conclusões tiradas ao longo do trabalho juntamente com a resposta aos objetivos inicialmente propostos apresentam-se no quinto capítulo. Por fim apresenta-se uma lista de toda as referências bibliográficas utilizadas para a realização de todo o trabalho e um conjunto de anexos.

Capítulo 2 – Doenças Neurodegenerativas

Atualmente, estima-se que existam cerca de 9,9 milhões de pessoas a nível europeu e 35,6 milhões a nível mundial a sofrerem de doenças neurodegenerativas que provocam algum tipo de demência. Para além disso, existe também a previsão de que no ano de 2030 esses valores dupliquem e tripliquem no ano de 2050. O aumento da esperança média de vida e do número de casos de pessoas com doenças neurodegenerativas tem levado a que haja uma intensificação da preocupação mundial na investigação das causas e dos possíveis tratamentos para este tipo de doenças, de modo a melhorar o nível de vida da população afetada (Pereira & Valado, 2021; World Health Organization, 2012).

As doenças neurodegenerativas são caracterizadas essencialmente pela morte ou perda progressiva de neurónios em regiões como o cérebro ou a medula espinal. A perda dos neurónios é permanente, ou seja, nestes casos não ocorre a renovação celular natural das células perdidas, o que leva a alterações ou perdas nas funções cognitivas e sensoriais. Alguns exemplos de doenças neurodegenerativas mais conhecidas são a doença de Alzheimer (DA), a doença de Parkinson (DP), a doença de Huntington (DH) e a esclerose lateral amiotrófica (ELA). No entanto existem outro tipo de doenças que podem apresentar alguns sintomas comuns das doenças neurodegenerativas tais como a depressão, perda de memória, alucinações, entre outras (Barbalace et al., 2019; Khazdair et al., 2019; Pereira & Valado, 2021).

O aparecimento das doenças neurodegenerativas pode ocorrer devido a vários tipos de causas entre elas, o stress oxidativo, a deposição anormal de proteínas no cérebro, função mitocondrial danificada, indução de apoptose, diminuição da proteostase, desequilíbrio da libertação de neurotransmissores, fenómenos de neuroinflamação, ou até mesmo devido à hereditariedade e envelhecimento. De entre todas estas causas, a neuroinflamação, o stress oxidativo e o desequilíbrio a nível dos neurotransmissores são aspetos importantes na patogénese de doenças neurodegenerativas como a DA e a DP (Khazdair et al., 2019).

A neuroinflamação é uma resposta do sistema imunitário do cérebro a uma inflamação que possa ocorrer a nível cerebral, que se traduz na ativação de células do sistema nervoso central (SNC) tais como as células gliais (microglia e astrócitos). Estas células apresentam um papel fundamental em ações pró e anti-inflamatórias, tais como a fagocitose, libertação de esteroides, redução de radicais livres e reparação celular. A ativação do sistema imunitário do cérebro para o combate de inflamações cerebrais pode apresentar resultados benéficos, uma vez que permite o controlo de inflamações que possam ter ocorrido no cérebro com a libertação dos mediadores anti-inflamatórios. Quando se trata de uma resposta de longa duração a uma neuroinflamação, é dado o nome de neuroinflamação crónica. Neste caso, continua a existir durante bastante tempo após o início da inflamação, tornando-se um processo prejudicial para o SNC, uma vez que ocorre a libertação de mediadores pró-inflamatórios e espécies reativas de oxigénio e nitrogénio (ROS e RNS) de forma prolongada e persistente (Barbalace et al., 2019; Milatovic et al., 2011).

As citocinas são exemplos de mediadores pró-inflamatórios (IL-1, TNF- α , GM-CSF, IL-3, IL-12, IL-18 e IFN- γ e ROS/RNS) e anti-inflamatórios (IL-4, IL-10, IL-13 e FTC β) libertados durante um processo inflamatório tal como a neuroinflamação, em que no caso dos mediadores pró-inflamatórios, tal como o nome indica, quando libertados promovem a continuidade do processo de inflamação. As citocinas mais comuns libertadas durante um processo de neuroinflamação são as interleucinas-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), e são os principais responsáveis por preparar uma resposta inflamatória e iniciar uma cascata de mediadores diretamente responsáveis por vários processos associados à inflamação. Para além destas citocinas, são libertadas citocinas como as interleucinas-3 (IL-3) e fator estimulante das colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), que apresentam como

função a estimulação de IL-1 e TNF- α que favorecem o processo inflamatório. Para além disso, as citocinas IL-12 e IL-18 são também libertadas de modo a estimular a libertação do interferão-gama (IFN- γ) que tal como a IL-1 e TNF- α favorecem o processo inflamatório. As elevadas concentrações destas citocinas promovem também a produção e libertação de radicais livres como o óxido nítrico (\cdot NO), que por sua vez promovem o stress oxidativo e nitrosativo (Cavaillon, 2001).

O \cdot NO é um radical livre bioativo que apresenta um papel fundamental como neurotransmissor e neuromodulador gasoso no SNC, ou seja, em concentrações baixas, o \cdot NO é vantajoso para o SNC uma vez que apresenta um papel fisiológico fundamental a nível da função das células neurais e vasculares. Por outro lado, em concentrações elevadas implica que possam existir processos de neuroinflamação, doenças neurodegenerativas, e outras doenças neurológicas. Este neurotransmissor apresenta uma ação distinta no SNC quando comparado com os neurotransmissores clássicos, uma vez que é sintetizado quando necessário, e difunde-se pelos terminais sinápticos nos quais pode atuar nas células onde é produzido, como também a nível das células vizinhas. Para além disso, o \cdot NO termina a sua ação após a sua reação com substratos intracelulares ao contrário do que acontece com os restantes neurotransmissores, que são armazenados em vesículas, libertados por exocitose ou inativados por recaptação ou degradação enzimática (Carreira, 2014; Ghasemi & Fatemi, 2014; Nakanishi et al., 2021; Saha & Pahan, 2006; J. Zhang et al., 2021).

O \cdot NO é produzido enzimaticamente a partir do aminoácido l-arginina pela atividade de três isoenzimas de óxido nítrico sintetase (NOS), tais como a NOS induzível (iNOS), a NOS neuronal (nNOS), e a NOS endotelial (eNOS), sendo que as duas últimas são dependentes do cálcio para a sua atividade, ao contrário da iNOS que apenas é expressa quando existem estímulos inflamatórios, ou seja, não é expressa em condições normais. Em casos de neuroinflamação, ou seja, quando existem estímulos inflamatórios agudos, como por exemplo a presença de citocinas IL-1 e TNF- α e a presença de proteína β -amiloide (A β), o \cdot NO é produzido a partir da iNOS que pode ser expressa em macrófagos, astrócitos, microglia, células endoteliais e neurónios. Para além disso, a presença do neurotransmissor glutamato durante uma resposta inflamatória está associada à ativação do nNOS que por sua vez leva à produção excessiva de \cdot NO que é também consequência da expressão de iNOS. A libertação de elevados níveis de \cdot NO pode conduzir à ocorrência de várias reações, sendo que este pode reagir com o oxigénio, originando dióxido de nitrogénio (NO₂) que se destaca por ser muito reativo e originar trióxido de dinitrogénio (N₂O₃) quando reage com \cdot NO. Para além destas reações, o \cdot NO pode reagir também com o radical superóxido (O₂ \cdot^-) originando peroxinitrito (ONOO \cdot) que também se destaca por ser um anião muito reativo. A estas moléculas reativas formadas a partir do radical \cdot NO dá-se a designação de espécies reativas de nitrogénio (RNS) e estas apresentam a capacidade de oxidar e nitrar outras moléculas ou células, levando ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas (Carreira, 2014; Ghasemi & Fatemi, 2014; Nakanishi et al., 2021; Saha & Pahan, 2006; J. Zhang et al., 2021).

O stress oxidativo ocorre quando não existe um equilíbrio entre as quantidades de oxidantes e antioxidantes nas células. Sob condições normais, a produção de ROS e RNS, tais como os radicais hidroxilo (\cdot OH), O₂ \cdot^- , e \cdot NO, e a espécie não radicalar H₂O₂, acaba por ser neutralizada pela capacidade antioxidante dos antioxidantes endógenos enzimáticos e não enzimáticos. Essas espécies são produzidas como subprodutos a nível das mitocôndrias, durante a fosforilação oxidativa para a produção de ATP no processo metabólico celular, e em níveis moderados de equilíbrio são essenciais para o crescimento e desenvolvimento dos neurónios. O equilíbrio da produção de ROS/RNS é controlado através do sistema antioxidante que é composto por enzimas antioxidantes como a catalase e superóxido dismutase (SOD), mas também por antioxidantes não enzimáticos como a glutatona reduzida (GSH), vitamina E e a Coenzima Q10 (Bhatt et al., 2020; Milatovic et al., 2011; Salim, 2017).

Por outro lado, quando a produção de ROS/RNS ocorre em níveis elevados, o sistema antioxidante excede a sua capacidade de neutralização das mesmas e prevalecem as reações de oxidação nas células, que são responsáveis por causar danos a nível das macromoléculas como os lípidos, proteínas e ácidos nucleicos (DNA), provocando o mau funcionamento celular, o que culminará em apoptose e necrose. Como o cérebro apresenta elevados conteúdos lipídicos, requer grande quantidade de energia, ou seja, é um grande consumidor de oxigénio, e apresenta fraca capacidade antioxidante, torna-se muito vulnerável ao stress oxidativo provocado pela produção excessiva de ROS/RNS. Como consequência, favorecem o aparecimento de doenças neurodegenerativas (Milatovic et al., 2011; Salim, 2017).

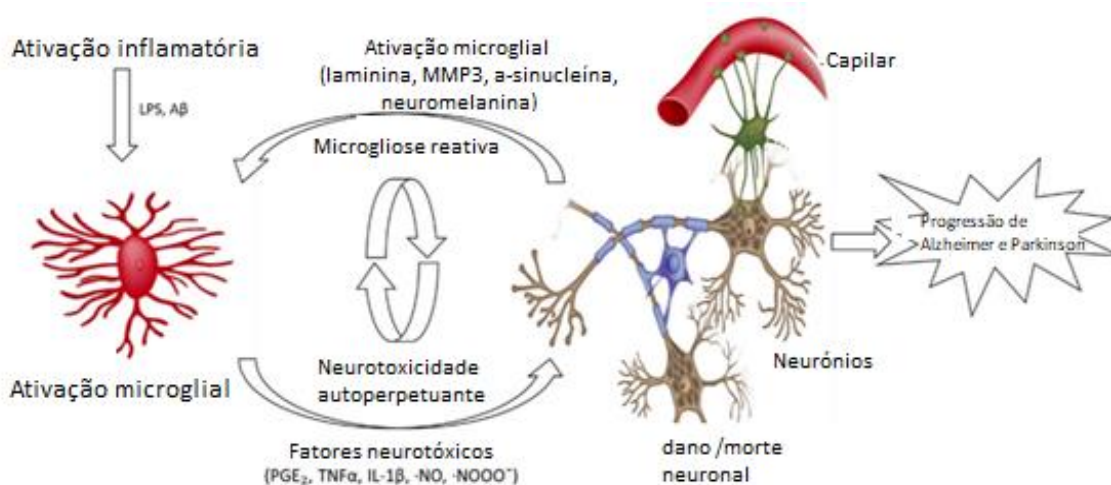


Figura 1. Relação entre a neuroinflamação e o stress oxidativo em doenças neurodegenerativas como DA e DP. Adaptado de (Pereira & Valado, 2021).

A neuroinflamação e o stress oxidativo podem estar relacionados, como se pode verificar na Figura 1, na medida em que uma neuroinflamação crónica pode levar a que ocorra stress oxidativo, pois como referido anteriormente, a neuroinflamação crónica provoca uma libertação prolongada de ROS/RNS. Assim sendo, como a neuroinflamação apresenta um papel relevante no aparecimento de doenças neurodegenerativas, torna-se necessário desenvolverem-se estratégias eficazes no tratamento da mesma. Atualmente, têm-se procurado através de investigação científica, compostos naturais com ação anti-inflamatória e antioxidante, como forma de proteção contra estas doenças (Barbalace et al., 2019; Khazdair et al., 2019; Milatovic et al., 2011; Salim, 2017).

O desequilíbrio na libertação de neurotransmissores é também apontado como uma das principais causas para o aparecimento de doenças neurodegenerativas, isto porque é através da libertação dos neurotransmissores que ocorrem as transmissões dos impulsos nervosos. Os neurotransmissores são armazenados em vesículas neuronais, e quando são libertados pelos neurónios difundem-se pela fenda sináptica até se ligarem momentaneamente a recetores específicos do neurónio adjacente. A resposta ao estímulo pode ser inibitória (inibir a atividade do neurónio pós-sináptico) ou excitatória (ativar o neurónio pós-sináptico) dependendo do recetor que recebe o neurotransmissor. No final da transmissão sináptica, parte do neurotransmissor pode ser reaproveitado pelo neurónio que o libertou e pode ser novamente armazenado em novas vesículas neuronais, outra parte do neurotransmissor pode ser metabolizado ou degradado por enzimas nos quais os produtos resultantes são libertados para o organismo. Sempre que ocorre a libertação de um neurotransmissor, ocorre seguidamente a síntese e o armazenamento de novas moléculas desse neurotransmissor, bem como também a produção de novas

vesículas neuronais para o armazenamento dos mesmos. Os principais neurotransmissores que influenciam o aparecimento de doenças neurodegenerativas são o glutamato, o ácido gama-aminobutírico (GABA), a serotonina (5-HT), a acetilcolina (ACh) e a dopamina (Beltrán Molina, 2017; Lovinger, 2008; Niyonambaza et al., 2019).

O glutamato é um dos principais neurotransmissores excitatórios no SNC e em níveis normais está associado à aprendizagem e memória. Em níveis elevados, o glutamato faz com que os seus recetores (por exemplo, os recetores ionotrópicos de N-metil D-aspartato (NMDA) e alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA)) estejam ativos durante mais tempo provocando uma cascata de sinalização intracelular dependentes de cálcio, levando à excitotoxicidade. Para além disso, o aumento dos níveis de cálcio provoca a ativação das nNOS e eNOS levando a um consequente aumento dos níveis de NO nas células ou neurónios provocando por sua vez stress oxidativo no SNC e favorecendo o aparecimento de doenças neurodegenerativas tais como a DA e a depressão. A memantina, muito usada no tratamento da DA, é um antagonista dos recetores NMDA que se liga aos mesmos possibilitando a regulação dos níveis de glutamato e diminuindo consequentemente a sua excitotoxicidade (Beltrán Molina, 2017; Niyonambaza et al., 2019).

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é o principal neurotransmissor inibitório do SNC e é sintetizado a partir do glutamato através da enzima glutamato descarboxilase. No entanto, a função do GABA opõe-se à função do glutamato, uma vez que o neurotransmissor GABA apresenta a função de reduzir a excitabilidade neuronal através da inibição da transmissão nervosa. Ou seja, este neurotransmissor quando se encontra em níveis normais tem a capacidade de inibir neurotransmissores excitatórios tais como o glutamato, de modo a manter a estabilidade nas funções neurológicas. Assim sendo, os níveis reduzidos deste neurotransmissor provocam crises de ansiedade que podem estar também associadas a sintomas de depressão (Niyonambaza et al., 2019; Ting Wong et al., 2003).

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) é um neurotransmissor do tipo monoamina que é produzida a partir da hidroxilação do triptofano através da enzima triptofano hidroxilase, resultando em 5-hidroxitriptofano que posteriormente é descarboxilado formando a serotonina. Assim sendo, os níveis de serotonina são controlados pela capacidade de captação do triptofano. Este neurotransmissor desempenha um papel fundamental em várias funções comportamentais na medida em que regula o sono, o estado de saciedade, a agressividade e as alterações de humor ou depressão. Ou seja, quando existem baixos níveis de serotonina existe a possibilidade de desenvolvimento de sintomas de depressão. As concentrações de triptofano e a atividade da enzima triptofano hidroxilase controlam os níveis de serotonina, ou seja, quando existem baixas concentrações de triptofano existem consequentemente baixas concentrações de serotonina. Para além disso a enzima monoamina oxidase A (MAO-A) apresenta também efeitos sobre os níveis de serotonina, uma vez que é uma enzima que promove a desaminação oxidativa das monoaminas após transmissão, e assim sendo, a sua ação provoca a diminuição dos níveis de serotonina (Beltrán Molina, 2017; Berger et al., 2009; Canto, 2014; Niyonambaza et al., 2019).

A acetilcolina (ACh) é o principal neurotransmissor responsável pelos processos cognitivos e de memória. Este neurotransmissor é sintetizado a partir da colina e da acetilcoenzima A pela ação da enzima colina acetiltransferase. No final da transmissão do impulso nervoso, o neurotransmissor é hidrolisado pela acetilcolinesterase (AChE) originando colina e acetato. Os níveis de ACh são regulados pela colina acetiltransferase e pela captação da colina para a produção de ACh. Níveis baixos do neurotransmissor ACh favorecem o aparecimento de doenças neurodegenerativas como a DA (Beltrán Molina, 2017; Niyonambaza et al., 2019).

As colinesterases dividem-se em dois tipos, a já referida AChE e a butirilcolinesterase (BuChE). Estas enzimas são evolutivamente semelhantes, no entanto a sua distribuição nos tecidos, as suas propriedades cinéticas e as suas especificidades para com o substrato, são fatores que permitem a sua diferenciação. Enquanto a AChE se encontra de forma abundante no SNC, nos músculos esqueléticos e na membrana de eritrócitos, a BuChE encontra-se de forma abundante no plasma sanguíneo. Relativamente à seletividade das enzimas, a AChE é a enzima mais seletiva uma vez que hidrolisa apenas a ACh. A BuChE é a menos seletiva uma vez que hidrolisa de uma forma semelhante tanto a ACh como a butirilcolina (BuCh) (Petronilho et al., 2011; H. Zhang et al., 2014).

A dopamina é um neurotransmissor inibidor que está envolvido no controlo motor, nas funções endócrinas, na cognição e nas emoções. A dopamina é produzida a partir da hidrólise do aminoácido tirosina através da enzima tirosina hidroxilase, da qual resulta a levodopa (L-DOPA) que por sua vez é descarboxilada e convertida em dopamina nos neurónios dopaminérgicos. A falta de dopamina no gânglio basal do cérebro leva a que ocorra a perda no controlo da realização de movimentos suaves e controlados, que é a principal causa da DP. Os níveis de dopamina são regulados pela L-DOPA que é o precursor para a produção da dopamina e pela captação de dopamina pelos recetores. Para além disso, como a dopamina é também uma monoamina, a ação das enzimas MAO-B e da tirosinase também apresenta efeitos na redução dos níveis de dopamina (Beltrán Molina, 2017; Canto, 2014; Estevinho & Soares Fortunato, 2003; Niyonambaza et al., 2019).

A tirosinase é uma enzima chave na produção de melanina na pele, no entanto está também associada ao processo metabólico de produção de neuromelanina que confere cor à substância nigra. O processo metabólico de produção de neuromelanina, representado na Figura 2, envolve 2 tipos de enzimas, a tirosinase e a tirosina hidroxilase, no qual a primeira é responsável por oxidar a tirosina (substrato) e a segunda é responsável pela sua hidrólise. A tirosina pode ser hidrolisada a L-DOPA pela tirosina hidroxilase, que será depois convertida em dopamina, ou ser oxidada pela tirosinase e produzir dopaquinona que é uma molécula extremamente instável que pode ligar-se a outras moléculas e produzir compostos perigosos capazes de deteriorar e destruir as células nervosas. Uma das etapas do processo de produção de neuromelanina envolve a auto-oxidação espontânea da dopaquinona, no entanto é uma etapa difícil de regular e assim sendo, podem ser atingidos níveis elevados desta molécula causando consequentemente o stress oxidativo, mas também uma indesejável inibição da tirosina hidroxilase responsável pela produção de dopamina (Masuda et al., 2005, 2007, 2008; Nagatsu et al., 2022).

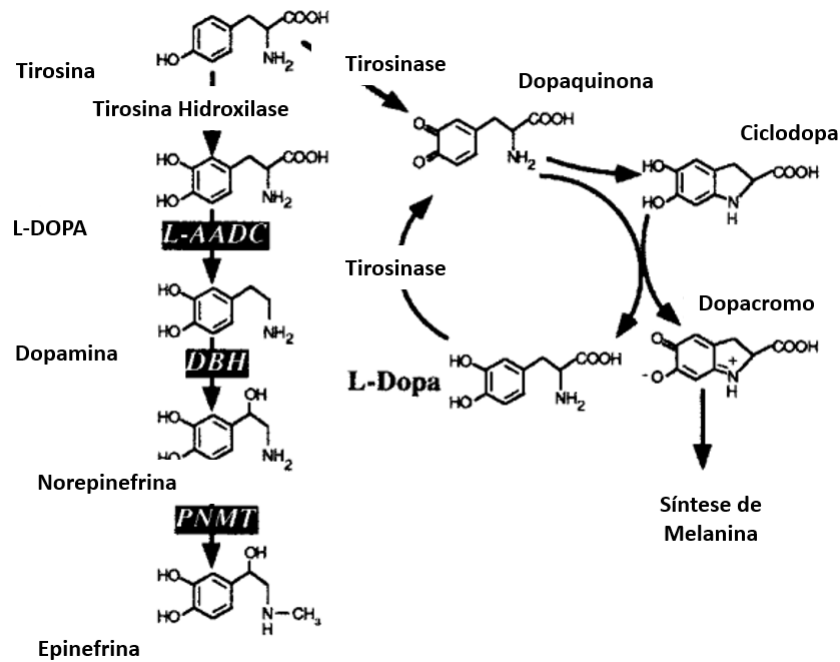


Figura 2. Mecanismo de biossíntese de neuromelanina (Eisenhofer et al., 2003).

A vulnerabilidade para estas doenças neurodegenerativas tem sido muito estudada, e sabe-se que o envelhecimento é um fator de risco. Isto deve-se ao facto de que o envelhecimento leva a uma lenta deterioração das funções homeostáticas cerebrais, na medida em que o equilíbrio entre as citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-10, IL-13 e $FTC\beta$, e pró-inflamatórias é comprometido, e há prevalência de citocinas pró-inflamatórias como por exemplo as mencionadas anteriormente tais como a IL-1, $TNF-\alpha$, GM-CSF, IL-3, IL-12, IL-18 e $IFN-\gamma$ e ROS/RNS. Por isso, à medida que o processo de envelhecimento decorre, o cérebro tem tendência a tornar-se mais vulnerável a neuroinflamações crónicas e stress oxidativo, e conseqüentemente ao aparecimento de doenças neurodegenerativas (Milatovic et al., 2011; World Health Organization, 2012).

2.1. Doença de Alzheimer

Segundo World Health Organization, 2021, a DA é considerada o tipo de demência mais comum sendo que pode representar cerca de 50 a 70% de todos os casos de demências. É conhecida por causar uma deterioração global de algumas funções cognitivas (memória, atenção, concentração, linguagem e pensamento) de forma progressiva e irreversível. Como consequência da deterioração das funções cognitivas, os pacientes apresentam frequentemente mudanças comportamentais, alterações na sua personalidade e na sua capacidade funcional, que impedem ou dificultam a realização das suas atividades normais diárias (Pereira & Valado, 2021).

Nos estágios iniciais, a DA apresenta sintomas ligeiros como pequenas perdas de memória e dificuldade em encontrar as palavras corretas que definem objetos utilizados no dia a dia. No entanto, à medida que as células cerebrais morrem e a DA progride, os sintomas começam a piorar e a afetar significativamente o nível de vida das pessoas com este tipo de doença, na medida em que nos estágios graves e terminais da doença é também afetada de forma progressiva a parte motora, até que no estágio terminal, os doentes tornam-se incapazes de andar e falar. (L. Pereira & Valado, 2021).

Os doentes com DA apresentam danos oxidativos significativos que estão essencialmente associados à acumulação anormal da proteína β -amiloide ($A\beta$) e à sua deposição sob a forma de oligómeros e placas, mas também devido à hiperfosforilação da proteína tau que nesse caso se dissocia dos microtúbulos neurais e forma emaranhados neurofibrilares. A presença e a acumulação das placas de $A\beta$ e a presença de emaranhados neurofibrilares no cérebro é responsável pelo desencadeamento de processos pró-inflamatórios, que consequentemente desencadeiam processos de neuroinflamação causando um aumento do stress oxidativo, que contribuem para a progressão da doença (Huang et al., 2016; Pereira & Valado, 2021; Tamagno et al., 2021)

Na Figura 3 estão representados os danos que a acumulação de $A\beta$ causam no desenvolvimento de DA.

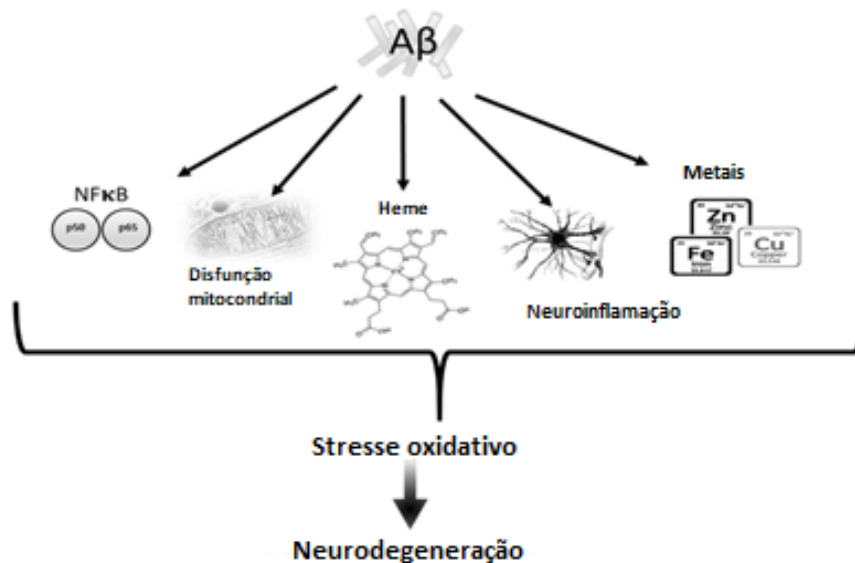


Figura 3. Representação esquemática dos danos que a acumulação de $A\beta$ causam no desenvolvimento de DA. Adaptado de (Tamagno et al., 2021).

Na DA, a neurodegeneração provoca a degradação dos neurónios envolvidos nos processos motores, cognitivos e na memória. A ACh é o principal neurotransmissor responsável pelos processos cognitivos e de memória mencionados, assim sendo, com a progressão da DA os níveis deste neurotransmissor vão diminuindo à medida que são degradados enzimaticamente pela enzima AChE (Araújo et al., 2016; Hannan et al., 2020; Petronilho et al., 2011).

A AChE é uma enzima da família das colinesterases, está presente no SNC e periférico, e tem como função a finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas através da hidrólise do neurotransmissor ACh (Araújo et al., 2016; Petronilho et al., 2011).

A ACh está armazenada nas vesículas sinápticas e é libertada pelos neurónios para a região sináptica quando o impulso nervoso chega ao axónio terminal. Após a libertação, a ACh liga-se aos recetores colinérgicos presentes no neurónio seguinte. Essa ligação ao recetor leva à formação de um novo impulso nervoso e assim sucessivamente de modo a dar continuidade à transmissão dos impulsos nervosos. No final da transmissão do impulso nervoso de um neurónio para o seguinte, é importante que a ligação entre a ACh e o recetor seja interrompida, pois caso contrário ocorre um excesso de transmissão nervosa que implica um mau funcionamento do organismo. Essa interrupção é realizada através da enzima AchE que degrada a ACh e procede à sua modificação transformando-o em colina (Ch) (reação apresentada na Figura 4) que posteriormente pode ser reabsorvida pelo primeiro neurónio do impulso, no qual passa a ser novamente convertida em ACh para a transmissão de um novo impulso nervoso. Na

Figura 5 apresenta-se de forma simplificada o modo de funcionamento da ACh e AChE na transmissão dos impulsos nervosos (Araújo et al., 2016; Petronilho et al., 2011).

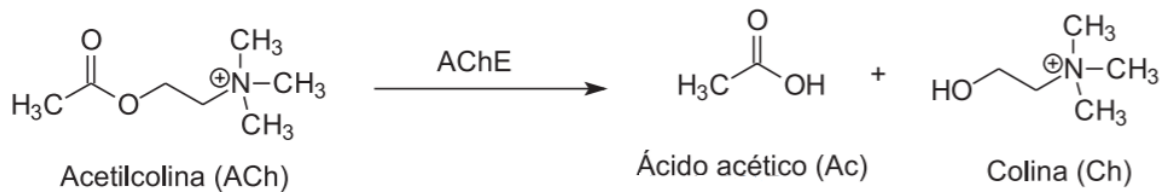


Figura 4. Reação de conversão da ACh pela AChE em Ch (Araújo et al., 2016).

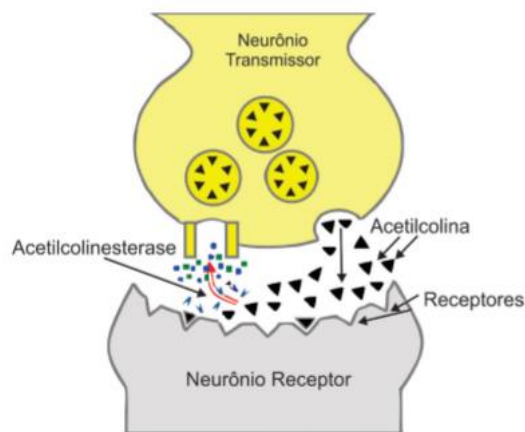


Figura 5. Representação esquemática do funcionamento geral da transmissão dos impulsos nervosos nos neurónios (Petronilho et al., 2011).

Como na DA existe um défice do neurotransmissor ACh, a ação da AChE durante a transmissão de um impulso nervoso provoca ainda mais a redução dos níveis de ACh, assim sendo, o alívio dos sintomas da DA está muitas vezes associado à ação de inibidores da enzima AChE que como o nome indica, inibem a ação da enzima levando a que exista um maior controlo dos níveis de ACh na transmissão dos impulsos nervosos. Por ação dos inibidores, a degradação do neurotransmissor ACh é retardada e este permanece durante mais tempo na fenda sináptica permitindo assim uma intensificação da transmissão colinérgica. Esta explicação pode ser verificada esquematicamente na Figura 6 na qual está representado o mecanismo normal de funcionamento da transmissão do impulso nervoso através da ação do ACh e da AChE, em comparação com a transmissão do impulso nervoso na presença de inibidores de AChE (Araújo et al., 2016; Petronilho et al., 2011).

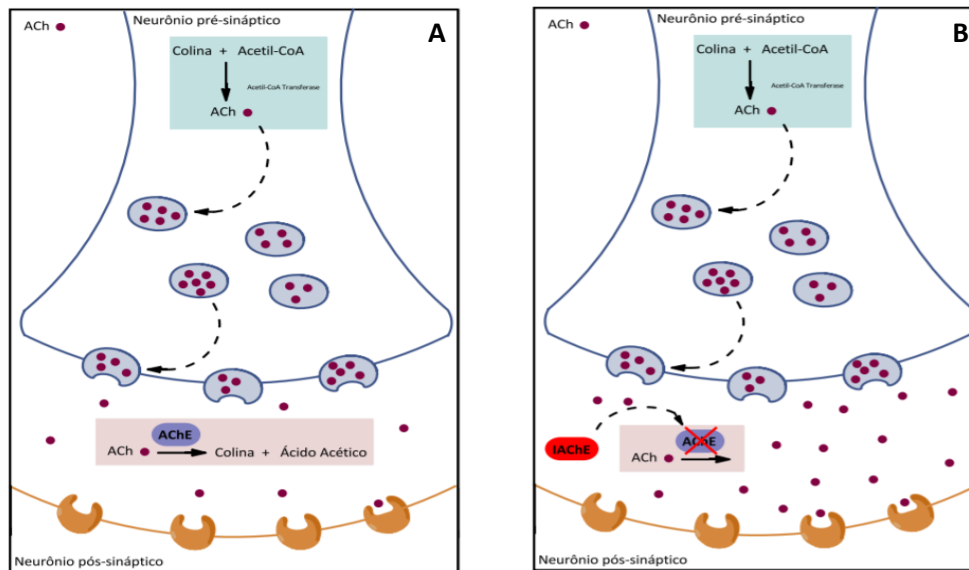


Figura 6. Funcionamento da transmissão do impulso nervoso de forma normal com ACh e AChE (A), e quando ocorre a ação de um inibidor de AChE (IACHÉ) (B) (Araújo et al., 2016).

Segundo a Alzheimer Portugal, 2022, existem em Portugal três inibidores de colinesterase licenciados para a utilização na DA, tais como o donepezil, a rivastigmina e a galantamina. No entanto, a memantina é também um dos fármacos que pode ser utilizado no alívio dos sintomas das fases intermédias e avançadas da DA, uma vez que é um antagonista dos recetores NMDA com a capacidade de bloquear a ligação do glutamato aos seus recetores e impedir a entrada de cálcio em excesso nas células cerebrais (Alzheimer Portugal, 2022).

2.2. Doença de Parkinson

A DP é considerada a segunda doença neurodegenerativa mais comum, e é uma doença lentamente progressiva que afeta todo o SNC. Segundo a World Health Organization, 2022, estimam que em 2019 existiram mais de 8,5 milhões de indivíduos com a DP e 329 000 mortes, um aumento de mais de 100% desde 2000.

A DP apresenta como principais sintomas a nível físico os tremores musculares enquanto estes estão em repouso, aumento da rigidez muscular, movimentos mais lentos dos músculos e instabilidade na postura, ou seja, instabilidade na manutenção do equilíbrio. Para além dos sintomas físicos, as pessoas com a DP apresentam também dificuldades a nível cognitivo, a nível do pensamento, e estudos recentes demonstram que a DP também pode ter relação no aparecimento da depressão e distúrbios a nível do sono (L. Pereira & Valado, 2021; Wei et al., 2018).

Esta doença está associada principalmente à degeneração dos neurónios dopaminérgicos nos gânglios basais da região substância nigra, que são responsáveis pela libertação de neurotransmissores que estimulam a transmissão dos impulsos nervosos neurónio a neurónio. O principal neurotransmissor produzido nos gânglios basais é a dopamina e tem como função intensificar os impulsos nervosos para o alcance dos músculos. Assim sendo, a perda de neurónios dopaminérgicos é responsável pelos sintomas motores da doença. Como referido anteriormente, os níveis de dopamina são regulados não só pela manutenção dos níveis de L-DOPA e pela captação de dopamina pelos recetores como também pela inibição da enzima MAO-B, na medida em que a inibição desta enzima permite que a dopamina não seja degradada e se mantenham controlados os níveis da mesma (Canto, 2014; Wei et al., 2018).

Além da MAO-B existe uma outra enzima, a tirosinase, que apresenta capacidade de oxidar a dopamina. Assim sendo, a inibição das enzimas MAO-B e tirosinase pode ser apontada como um possível tratamento no alívio dos sintomas da DP. Para além disso, tal como na DA, a neuroinflamação e o stress oxidativo surgem cada vez mais como algumas das principais causas pela perda ou degeneração dos neurónios dopaminérgicos, como se pode verificar na representação esquemática da Figura 7 (Canto, 2014; Wei et al., 2018).

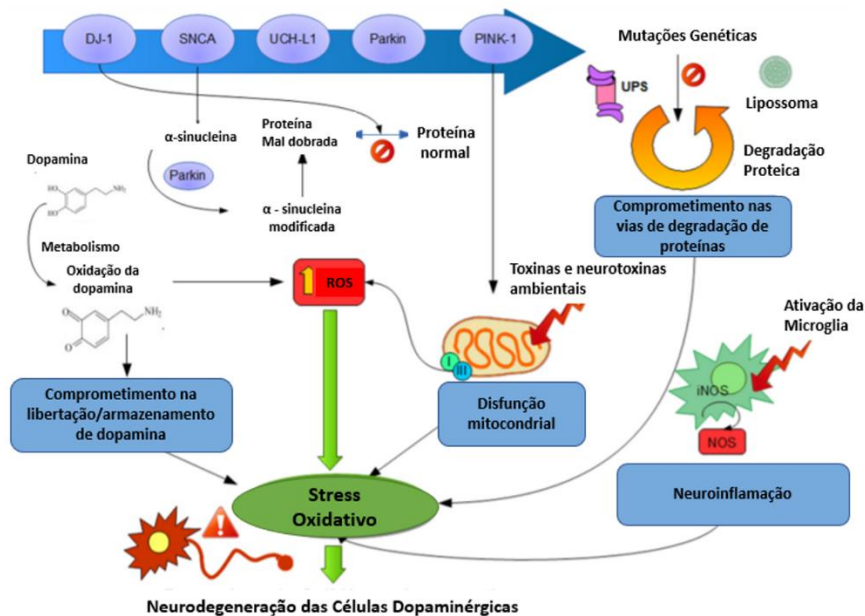


Figura 7. Processos fisiológicos relacionados com a degeneração dos neurónios dopaminérgicos e consequentemente o aparecimento da DP. Legenda: DJ-1, SNCA, UCH-L1, Parkin PINK-1 – genes causadores da DP; UPS- proteossoma. Adaptado de (Wei et al., 2018).

Os medicamentos utilizados no tratamento da DP podem ser precursores da dopamina (levodopa), agonistas da dopamina (pramipexol, ropinirol, apomorfina e rotigotina), e inibidores da MAO-B (rasagilina, selegilina) (MSD, 2022).

2.3. Depressão

A depressão profunda, é considerada uma doença responsável pelo aparecimento de sintomas graves e persistentes de perturbações de humor, tais como sentimentos de culpa, insónias, irritabilidade mental, baixa autoestima, fadiga, anedonia, entre outros. Assim sendo, pela vasta lista de sintomas que apresenta, é considerada uma das doenças neuropsiquiátricas mais comuns que afetam as funções cognitivas, e consequentemente a qualidade de vida. Para além disso, a depressão é uma doença que se pode manifestar em simultâneo com doenças como a obesidade, diabetes, ansiedade, esquizofrenia, DA e DP. As características da depressão profunda como sua gravidade e patogénese, são influenciadas por fatores como a genética, mas também por fatores psicológicos, ambientais e biológicos (Bajpai et al., 2014; Bhatt et al., 2020).

A nível global, segundo a World Health Organization, 2021, estima-se que 3,8 % da população apresenta depressão, em que 5,0 % são adultos e 5,7 % são adultos com mais de 60 anos de idade. Ou seja, 280 milhões de pessoas em todo o mundo sofrem de depressão, sendo que 700 000 morrem todos

os anos devido a suicídio, uma vez que cerca de 75 % da população que sofre de depressão não usufrui de qualquer tipo de tratamento.

Evidências científicas recentes demonstram que a depressão está também associada a alterações na função cerebral, na plasticidade neuronal, e na redução do volume do córtex frontal e do hipocampo. Sabe-se também que a principal causa para estas perturbações é o stress oxidativo/nitrosativo causado pela libertação descontrolada de ROS e RNS durante os processos de neuroinflamação, mas também devido à desregulação de neurotransmissores tais como o glutamato, a serotonina e o GABA mencionados anteriormente. Como já referido, o glutamato em níveis elevados provoca sintomas característicos da depressão, no entanto, os seus níveis podem ser controlados naturalmente pelo equilíbrio com o neurotransmissor inibitório GABA. No entanto, quando os seus níveis também se apresentam alterados não é possível esse controlo e prevalecem os sintomas da depressão. Para além destes neurotransmissores, os níveis baixos da serotonina também são responsáveis pelos sintomas da depressão, e neste caso a ação de inibidores da MAO-A podem controlar os níveis deste neurotransmissor, uma vez que permitem controlar a ação da enzima MAO-A de modo que esta seja inibida de degradar a serotonina (Bajpai et al., 2014; Bhatt et al., 2020; Canto, 2014; Caruso et al., 2019).

Na Figura 8 apresenta-se, de forma simplificada, a influência do stress oxidativo e da disfunção mitocondrial no desenvolvimento da depressão, sendo que para este estudo o stress oxidativo é o fator de maior relevância.

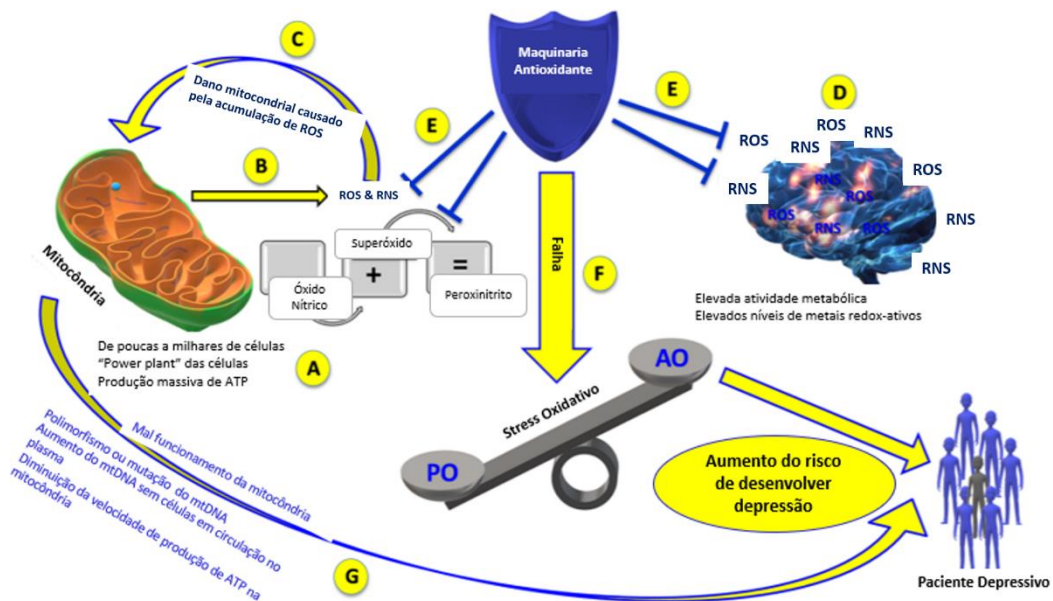


Figura 8. Esquema representativo da relação entre o stress oxidativo e o risco de desenvolvimento da depressão. **Legenda:** (A) Representação da fisiologia da mitocôndria; (B) Produção de grandes quantidades de ROS e RNS juntamente com ATP; (C) Aumento da vulnerabilidade da mitocôndria; (D) Aumento da vulnerabilidade do cérebro; (E) Danos oxidativos; (F) Falha na capacidade antioxidante para equilibrar a produção de ROS/RNS e desenvolvimento do stress oxidativo. (G) Mau funcionamento das mitocôndrias. AO, antioxidantes; PO, pró-oxidantes. Adaptado de (Caruso et al., 2019).

Os medicamentos usados para o tratamento da depressão incluem os inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRSs) tais como o citalopram, escitalopram, fluoxetina, fluvoxamina, paroxetina, sertralina e vilazodona. Também podem ser usados medicamentos inibidores da recaptção de noradrenalina-dopamina tais como a bupropiona; moduladores de serotonina como a mirtazapina a trazodona; inibidores de recaptção de serotonina-noradrenalina como a desvenlafaxina, duloxetina, levomilnaciprana e venlafaxina; antidepressivos heterocíclicos e tricíclicos como a amitriptilina, amoxapina, clomipramina, desipramina, doxepina, imipramina, maprotilina, nortriptilina, protriptilina e

trimipramina; e inibidores das MAO-B, como a isocarboxazida, fenelzina, selegilina e tranilcipromina (MSD, 2022).

2.4. Tratamento e Prevenção com Algas Marinhas

Com o aumento da incidência das doenças neurodegenerativas e neuropsiquiátricas, tais como as referidas DA, DP e a depressão, existe cada vez mais a preocupação no desenvolvimento de algum tipo de tratamento ou prevenção para estas doenças. Por essa razão, tem-se intensificado a identificação ou desenvolvimento de agentes neuroprotetores seguros que possibilitem a melhoria dos sintomas das doenças. No entanto, os agentes neuroprotetores sintéticos desenvolvidos apresentam normalmente efeitos secundários, tais como sonolência, cansaço, dormência nos membros superiores e inferiores, nervosismo, ansiedade, entre outros. Ou seja, apesar dos agentes neuroprotetores sintéticos possibilitarem a melhoria dos sintomas, isso não significa que os doentes afetados por essas doenças apresentem uma total melhoria na sua qualidade de vida, devido aos efeitos secundários. Por isso, tem-se dado destaque ao estudo de compostos bioativos naturais que apresentem função neuroprotetora, devido à sua elevada diversidade estrutural e ao facto de serem moléculas complexas que podem atuar em vários alvos em simultâneo, vantagens estas que muito dificilmente se encontram em compostos sintéticos, pois não é possível laboratorialmente produzirem-se moléculas com uma complexidade tão elevada como a dos compostos naturais (Hannan et al., 2020).

As algas marinhas, pela sua abundância no meio aquático e pela sua constituição, apresentam um forte potencial como fontes renováveis para a produção de alimentos funcionais e produtos industriais e fármacos. De entre todos os tipos de algas marinhas, as macroalgas castanhas (Ochrophyta), verdes (Chlorophyta) e vermelhas (Rhodophyta) são as mais promissoras. Isto deve-se à singularidade estrutural e à sua diversidade funcional, pois contém compostos ou metabolitos de interesse medicinal tais como, compostos fenólicos, terpenoides, flavonoides, carotenoides, fitoesteróis, proteínas, ácidos gordos, alcaloides e polissacarídeos. Todos estes compostos naturais mencionados apresentam capacidade neuroprotetora contra doenças neurodegenerativas, devido às suas capacidades antioxidantes, anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Evidências científicas recentes mostram que compostos como a fucoxantina (carotenoide), o fucosterol (esterol) e o fucoidano (polissacarídeo) presentes nessas algas marinhas apresentam um grande potencial no desenvolvimento de tratamentos contra doenças que afetam o SNC (Hannan et al., 2020).

Apesar da elevada variedade de algas marinhas e as suas diferentes composições, a alga marinha *U. pinnatifida* apresenta-se como o foco deste estudo na avaliação das suas propriedades para o tratamento ou prevenção de doenças como DA, DP e a depressão (Hannan et al., 2020; L. Wang et al., 2018).

2.4.1. Alga marinha *Undaria pinnatifida*

A *U. pinnatifida*, mais conhecida como wakame, representada na Figura 9, é uma alga marinha castanha (Filo Ochrophyta), a qual é nativa de países asiáticos tais como a Coreia, a China e o Japão, sendo que se trata de uma alga muito conhecida e bastante utilizada para a alimentação em todo o continente asiático. Em 1971, a *U. pinnatifida* foi levada para a França para fins alimentares, aclimatou-se e tornou-se numa espécie invasora, sendo que atualmente está presente em Espanha, Portugal, e em diversos países europeus atlânticos. Atualmente, cerca de 56 % do fornecimento europeu para consumo

é proveniente da Ásia, no entanto é também produzida em Espanha, França e Holanda para o mercado interno (Pedro et al., 2021).

O controlo das quantidades desta alga no meio ambiente é de extrema importância, uma vez que por ser invasora impede o crescimento de outros tipos de algas e organismos importantes nos ecossistemas. A sua eliminação dos ecossistemas acarreta diversas dificuldades sendo que em muitos dos casos a sua remoção é feita manualmente por mergulhadores e descartada, como é o caso do que ocorreu na Nova Zelândia em 2021, no qual um conjunto de mergulhadores recolheu cerca de 30 toneladas desta alga de modo a tentar o controlo da mesma nos habitats marinhos. As 30 toneladas de *U. pinnatifida* foram de seguida descartadas sem sofrerem qualquer tipo de valorização, havendo consequentemente um desperdício de recursos (Pedro et al., 2021; Uys, 2022).



Figura 9. Alga marinha *Undaria pinnatifida* (Esler, 2015).

Tal como as outras espécies de algas, a *U. pinnatifida* apresenta na sua constituição diversos compostos bioativos como polissacarídeos, polifenóis, ácidos gordos polinsaturados, péptidos, fitoesteróis e vitaminas. Esta alga apresenta atividade antioxidante, anti-inflamatória e antiviral, sendo que apresenta também benefícios no controlo da hipertensão arterial e na obesidade. Por esta razão, a produção da *U. pinnatifida* tem vindo a aumentar para a produção de alimentos funcionais, mas também produtos farmacêuticos, devido às suas propriedades bioativas no tratamento de doenças importantes, mas também devido ao facto de não serem conhecidos efeitos secundários para o organismo humano (Hannan et al., 2020; H. Zhang et al., 2014).

As propriedades bioativas da *U. pinnatifida* mais relevantes para o tratamento das doenças neurodegenerativas são as atividades anti-inflamatória e antioxidante que são particularmente devido a compostos como a fucoxantina, fucoidano, fucosterol, e outros compostos fenólicos como os florotaninos (Figura 10).

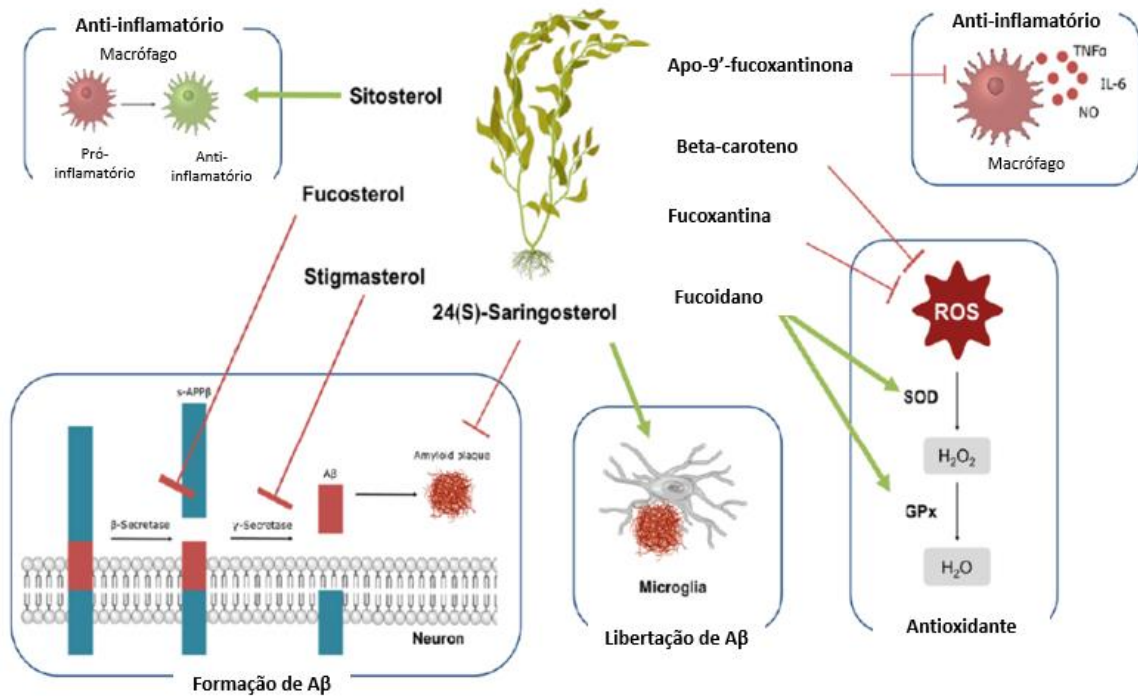


Figura 10. Compostos bioativos com atividades neuroprotetoras presentes nas algas marinhas e o seu foco de ação. Adaptado de (Schepers et al., 2020).

2.4.1.1. Fucoxantina

Como referido anteriormente, o stress oxidativo que pode ocorrer nas células e nos neurónios, pode ser controlado pela ação de antioxidantes. Pela variedade de compostos bioativos que a *U. pinnatifida* apresenta, tem sido estudada a possibilidade de apresentar capacidade antioxidante (Fung et al., 2013; L. Wang et al., 2018; H. Zhang et al., 2015).

O carotenoide fucoxantina é um dos compostos bioativos presentes na *U. pinnatifida* e um dos responsáveis pela sua forte atividade antioxidante. Este composto apresenta uma estrutura molecular única, com uma ligação alélica invulgar 5,6-monoepóxido, 9 ligações duplas conjugadas e alguns grupos de oxigénio funcionais tais como os grupos hidroxilo, epóxido, carbonilo e carboxilo, como se pode verificar na Figura 11 (Fung et al., 2013; L. Wang et al., 2018; H. Zhang et al., 2015).

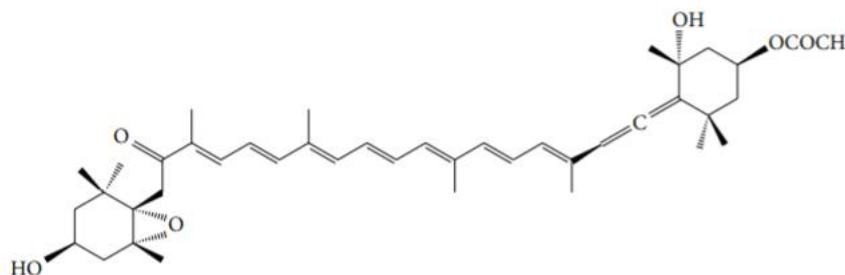


Figura 11. Estrutura molecular do carotenoide fucoxantina (H. Zhang et al., 2015).

Devido à estrutura invulgar e à quiralidade, a fucoxantina é instável, o que torna este carotenoide suscetível ao aquecimento, à exposição ao ar e à iluminação. No entanto, a sua instabilidade tem sido

estudada de forma aprofundada, e provou-se que o seu forte poder antioxidante é devido a essa instabilidade e à ligação alélica invulgar, no qual é possível a remoção de ROS como o radical $O_2^{\cdot-}$ e a espécie não radicalar H_2O_2 . Assim sendo, uma suplementação com o carotenoide fucoxantina permite um melhor controlo no equilíbrio entre ROS e RNS, uma vez que este antioxidante natural apresenta a capacidade de se ligar quimicamente aos radicais livres tornando-os moléculas estáveis. Apesar da forte atividade antioxidante, a fucoxantina é também reconhecida por apresentar atividade anti-inflamatória (controla a secreção de citocinas pró-inflamatórias), antidiabética, anti obesidade, anti carcinogénica, hepatoprotetora, e efeitos protetores cardiovasculares e cerebrovasculares (Fung et al., 2013; L. Wang et al., 2018; H. Zhang et al., 2015).

Para além das atividades previamente referidas, a fucoxantina apresenta também uma atividade inibitória das enzimas MAO (MAO-A com um $IC_{50}=197,41 \pm 2,20 \mu M$ e MAO-B com um $IC_{50}=211,12 \pm 1,17 \mu M$) que estão ligadas à degradação de neurotransmissores como a serotonina e a dopamina. Estudos demonstram que a fucoxantina apresenta também atividade inibitória das colinesterases (AChE, com um $IC_{50}=81,2 \mu M$.) atividade esta que é favorável ao tratamento da DA (Aljanabi et al., 2021).

2.4.1.2. Fucoidano

O fucoidano, representado na Figura 12, pertencente ao grupo dos polissacarídeos sulfatados, também é um composto presente na *U. pinnatifida* que apresenta também atividade antioxidante, no entanto, ao contrário da fucoxantina, este trata-se de um antioxidante secundário, ou seja, não interage diretamente com os radicais livres de modo a torna-los estáveis, mas neste caso interage com os hidroperóxidos decompondo-os de modo a impedir que os mesmos se tornem em peróxido, uma ROS. Este antioxidante secundário apresenta uma forte atividade antioxidante, quando avaliado a nível do sequestro dos radicais $\cdot OH$ apresentando um sequestro de $76,97 \pm 1,69 \%$ para uma concentração de $2,0 \text{ mg/mL}$ de fucoidano, e contra o DPPH \cdot uma concentração de antioxidante de $7,43 \pm 0,99 \mu g$ de trolox equivalentes/mL. Esta atividade antioxidante pode ser comparável aos antioxidantes secundários mais conhecidos tais como o hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT). Alguns estudos demonstram até que a capacidade antioxidante do fucoidano pode até ser maior do que os antioxidantes BHA, BHT e α -tocoferol (Koh et al., 2019; L. Wang et al., 2018; Zhao et al., 2018).

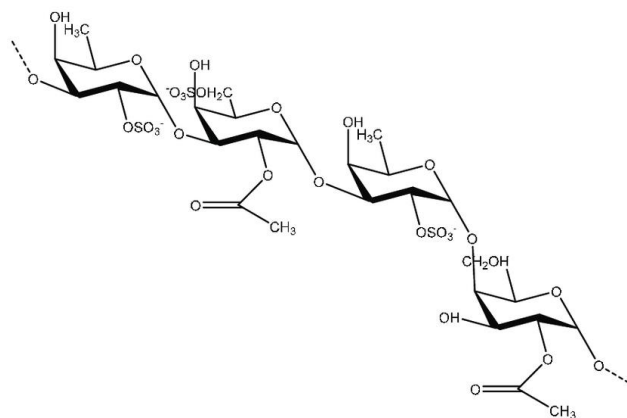


Figura 12. Estrutura molecular do polissacarídeo sulfatado fucoidano (Koh et al., 2019).

A atividade antioxidante do polissacarídeo fucoidano é em muitos estudos explicada pela presença de grupos sulfatados. Para além disso, a massa molecular da molécula deste polissacarídeo é também apresentada como um fator de variação da capacidade antioxidante, na medida em que se

comprovou que quanto maior a massa e número de grupos sulfatados, maior é a capacidade antioxidante deste composto. Os monossacarídeos mais abundantes na molécula de fucoidano presentes em *U. pinnatifida* são a manose, a fucose e a galactose, no entanto, este polissacarídeo apresenta também monossacarídeos como a xilose, glucose e ramnose (Koh et al., 2019; L. Wang et al., 2018; Zhao et al., 2018).

O fucoidano é também um composto natural com excelentes atividades inibitórias das enzimas MAO (MAO-A com um $IC_{50}=12,3 \pm 1,5 \mu M$ e MAO-B com um $IC_{50}=52,0 \pm 3,1 \mu M$), e também das enzimas AChE e BuChE (com um $IC_{50}=75,2 \pm 4,3 \mu M$ e $IC_{50}=70,1 \pm 3,0 \mu M$, respetivamente) atividade esta que é importante para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a DA, pelo controlo dos níveis de ACh e BuCh, e também na DP e depressão, pelo controlo nos neurotransmissores serotonina e dopamina (Sanjeewa et al., 2021; Subaraja et al., 2020).

Tal como a fucoxantina, o fucoidano apresenta diversas propriedades bioativas para além da atividade antioxidante, tais como atividade antiviral, anticoagulante e anti tumoral, o que o torna um composto de grande interesse tanto para as indústrias farmacêuticas como para as indústrias de alimentos funcionais (Koh et al., 2019; L. Wang et al., 2018; Zhao et al., 2018).

2.4.1.3. Fucosterol

O fucosterol, cuja estrutura molecular está representada na Figura 13, é um isómero de ligação de um estigmasterol, da família dos fitoesteróis, e está presente em maiores níveis nas algas castanhas, sendo que pode representar cerca de 4 a 95 % de todo o conteúdo de fitoesteróis das mesmas. Em relação à alga *U. pinnatifida* o teor de fucosterol varia entre os 83 % e os 97 % do total de esteróis presentes (Hannan et al., 2020; Meinita et al., 2021).

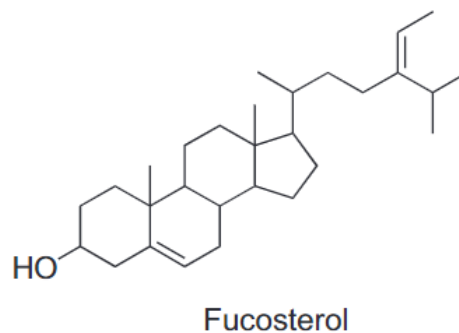


Figura 13. Estrutura molecular do esteroide fucosterol (Zhen et al., 2015).

Tal como a fucoxantina e o fucoidano, o fucosterol pode apresentar também ação antioxidante responsável por inibir o stress oxidativo que pode levar ao aparecimento de doenças DA, DP e depressão. Por outro lado, apresenta várias outras propriedades bioativas, sendo que uma das mais relevantes é a atividade anti-inflamatória que ocorre também nestes tipos de doenças neurodegenerativas (Hannan et al., 2020; Meinita et al., 2021).

Em relação à atividade anti-inflamatória, o fucosterol apresenta maior relevância no tratamento ou prevenção da DA, isto porque vários estudos referem que este composto juntamente com a fucoxantina apresenta a capacidade de inibir a enzima β -secretase ($IC_{50}=64,12 \pm 1,0 \mu M$) que é responsável pela produção de $A\beta$, que em níveis elevados, como referido anteriormente, desencadeia

processos pró-inflamatórios que consequentemente desencadeiam processos de neuroinflamação causando um aumento do stress oxidativo, que contribuem para a progressão da DA (Hannan et al., 2020; Meinita et al., 2021; Zhen et al., 2015).

Para além disso, estudos demonstram que o fucosterol apresenta também uma baixa capacidade inibidora das enzimas AChE e BuChE, com percentagens de inibição de 10,99-20,71 % e 4,53-17,53 %, respetivamente, quando testadas as gamas de concentração de fucosterol de 0,0-56 μ M (Vecchio et al., 2021; Yoon et al., 2008).

2.4.1.4. Glicoproteínas

Para além da *U. pinnatifida* apresentar estes compostos bioativos importantes (fucoxantina, fucoídano e fucosterol) com propriedades bioativas importantes para a diminuição dos processos de neuroinflamação e stress oxidativo, apresenta também outros compostos importantes no alívio dos sintomas das doenças, nomeadamente na DA. Vários estudos científicos demonstram que as glicoproteínas presentes na alga marinha *U. pinnatifida* apresentam uma elevada ação inibitória para a enzima AChE e BuChE ($IC_{50}=63,56 \pm 1,86 \mu\text{g/mL}$ e $IC_{50}=99,03 \pm 4,64 \mu\text{g/mL}$, respetivamente) que como referido anteriormente, retarda a degradação do neurotransmissor ACh permitindo assim uma intensificação da transmissão colinérgica. Deste modo, as glicoproteínas purificadas da alga marinha *U. pinnatifida* podem ser utilizadas como um medicamento natural para o alívio dos sintomas provocados pela DA (Hannan et al., 2020; Rafiquzzaman et al., 2015).

Em relação às restantes doenças neurodegenerativas, as glicoproteínas apresentam também ação antioxidante contra o stress oxidativo e ação anti-inflamatória contra os processos de neuroinflamação que ocorrem pela deposição e acumulação de $A\beta$, na medida em que inibem a β -secretase com um $IC_{50}=73,35 \pm 3,45 \mu\text{g/mL}$ (Hannan et al., 2020; Rafiquzzaman et al., 2015).

2.4.1.5. Compostos Fenólicos – Florotaninos

Os compostos fenólicos são também uma classe de metabolitos secundários que estão também presentes nas algas marinhas tais como a *U. pinnatifida*, que apresentam como estrutura de base um anel aromático de benzeno com um ou várias ligações a grupos hidroxilo. Dependendo do número de átomos de carbono da molécula e do grupo funcional ligado ao anel aromático, estes compostos podem ser classificados por diferentes subclasses, tais como os flavonoides, florotaninos, entre outros (Cruz, 2018; Oliveira, 2015).

Os flavonoides são o maior grupo de compostos fenólicos e na *U. pinnatifida* foram identificados flavonoides como a catequina, epigalhocatequina, epicatequina galhato, catequina galhato, epigalhocatequina galhato, epicatequina galhato. Os florotaninos são também compostos abundantes na classe de algas marinhas castanhas, e podem ser divididos em classes distintas de acordo com as ligações do seu monómero, o floriglucinol (Cruz, 2018; Oliveira, 2015).

Devido às suas estruturas, estes compostos são conhecidos pela atividade antioxidante, no qual através do estudo do sequestro do DPPH por um extrato de *U. pinnatifida*, foi obtido um $IC_{50}=13,81 \pm 0,31 \mu\text{g/mL}$ (Oliveira, 2015).

Em suma, pela análise dos subcapítulos anteriores, é possível verificar que a macroalga *U. pinnatifida* apresenta vários contributos neuro farmacológicos, tais como ação antioxidante, anti-

inflamatória, anti-colinesterásica, antiamiloidogénica, antienvelhecimento, entre outras. Para além disso, também é possível verificar que os seus efeitos neuroprotetores não se devem apenas a um único composto, mas a uma sinergia entre vários compostos principalmente entre a fucoxantina, fucoidano, fucosterol, glicoproteínas e florotaninos, uma vez que estes compostos apresentam várias propriedades farmacológicas semelhantes. Assim sendo, pelas diversas propriedades que apresentam como neuroprotetores, estes compostos são considerados candidatos potenciais para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas (Hannan et al., 2020).

Assim sendo e como já referido previamente, este trabalho teve como objetivo o estudo das propriedades bioquímicas da *U. pinnatifida* e a sua influência no tratamento ou prevenção de doenças neurodegenerativas como DA, DP e neuropsiquiátricas, como a depressão, através da avaliação da sua atividade antioxidante contra o stress oxidativo e a sua atividade neuroprotetora.

2.4.2. Extração e purificação dos compostos bioativos

Os processos de recuperação dos compostos bioativos presentes nas algas marinhas podem requerer inicialmente um pré-tratamento da matéria-prima, seguida de etapas de extração que podem ser simples ou múltiplas, seguindo-se por fim a separação e concentração dos extratos obtidos (Matos et al., 2021; Meregalli, 2017).

De entre todas as etapas de recuperação mencionadas, a extração é a fase ou processo que apresenta maior importância, isto porque se trata de uma operação unitária que permite a separação dos compostos de interesse do restante conteúdo de uma matriz sólida ou líquida, e pode envolver processos químicos, físicos e ou mecânicos. Assim sendo, esta etapa influencia todo o resultado final do extrato obtido, nomeadamente a sua composição, influenciando também consequentemente o seu efeito nas atividades antioxidantes e neuroprotetoras, por exemplo. Por isso, as técnicas usadas são de grande importância para otimizar a extração dos compostos bioativos de interesse (Matos et al., 2021; Meregalli, 2017).

Os métodos de extração devem ser escolhidos tendo em conta a estrutura da matriz da amostra e dos compostos que se pretendem extrair, e dividem-se em dois tipos de métodos, sendo eles os métodos convencionais e os métodos não convencionais (Matos et al., 2021; Meregalli, 2017).

Os métodos de extração convencionais de compostos bioativos presentes nas algas marinhas dependem da espécie de alga e do composto que se pretende extrair, e podem ser a infusão, a extração por Soxhlet, a maceração, a destilação, entre outros (Lourenço-Lopes et al., 2020; Matos et al., 2021; Meregalli, 2017). A escolha do solvente a utilizar é muito importante para a solubilização do composto de interesse, por isso o solvente deve ser seletivo, e apresentar grande eficiência na transferência de massa e difusão em combinação com várias tecnologias de extração. Os solventes normalmente utilizados nos métodos de extração convencionais são solventes orgânicos tais como o hexano, clorofórmio, metanol, etanol, entre outros. Para além da utilização de solventes, os métodos convencionais utilizam normalmente o aquecimento de modo a facilitar a extração, na medida em que o aquecimento permite que existam processos de convecção e condução do solvente com a matriz da amostra, facilitando o contacto do solvente com os compostos de interesse presentes (Matos et al., 2021; Meregalli, 2017). As desvantagens dos métodos de extração convencionais são os elevados tempos de extração e a utilização de grandes quantidades de solventes químicos que muitas vezes apresentam perigosidade para o meio ambiente. Além disso, a utilização de solventes perigosos torna necessário a

realização de um processamento a jusante para cumprir os regulamentos da indústria alimentar e farmacêutica para a aplicação de produtos finais seguros (Matos et al., 2021; Meregalli, 2017).

Devido a estas desvantagens principalmente a nível dos tempos de extração e dos solventes químicos perigosos utilizados, têm sido cada vez mais abordados outros métodos como alternativas mais verdes que permitem a redução da energia utilizada, redução das quantidades de solventes utilizados e a redução dos tempos de extração (Lourenço-Lopes et al., 2020; Matos et al., 2021; Meregalli, 2017).

Tal como nos métodos convencionais, estes métodos necessitam da utilização de solventes, no entanto neste caso os solventes utilizados são mais sustentáveis, e dividem-se em líquidos iónicos, solventes produzidos a partir da biomassa, água subcrítica, dióxido de carbono supercrítico, solventes eutécticos e tensioativos (Lourenço-Lopes et al., 2020; Matos et al., 2021; Meregalli, 2017).

Os métodos não convencionais dividem-se em extração assistida por micro-ondas (MAE), extração pela ação de enzimas, extração com fluidos supercríticos (SFE) e subcríticos, extração assistida por ultrassons (UAE), extração com líquidos pressurizados (PLE), entre outros. As vantagens e desvantagens destes métodos não convencionais estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Exemplos de alguns métodos de extração não convencionais juntamente com as suas vantagens e desvantagens em relação aos métodos convencionais (Lourenço-Lopes et al., 2020; Matos et al., 2021; Meregalli, 2017).

Métodos não convencionais	Vantagens	Desvantagens
Extração assistida por micro-ondas (MAE)	<ul style="list-style-type: none"> - Tempos de extração curtos; - Baixo consumo de solventes; - Maior eficiência do que o aquecimento convencional; - Possibilidade da redução da temperatura de extração através da utilização de pressões mais elevadas pela utilização de vasos fechados; - Podem ser usados solventes orgânicos ou água para a extração; - Apresenta rendimentos de extração elevados. 	<ul style="list-style-type: none"> - Apenas podem ser usados solventes com elevadas propriedades dielétricas; - Quando se usam vasos abertos existe a possibilidade de degradação dos compostos mais termolábeis pela utilização de temperaturas de aquecimento mais elevadas; - Dificuldade de aumento de escala
Extração assistida por ultrassons (UAE)	<ul style="list-style-type: none"> - Tempos de extração curtos; - Baixo consumo de solventes; - Elevada eficiência na rutura celular; - Apresenta rendimentos de extração elevados; - Favorável para a extração de compostos termolábeis; - Método de realização barato. 	<ul style="list-style-type: none"> - Requer a utilização de solventes com baixa tensão superficial, baixa viscosidade e baixa pressão de vapor; - Os ultrassons geram calor e a temperatura de extração pode ser difícil de controlar/manter; - O excesso de tempo em contacto com os ultrassons pode danificar a qualidade dos extratos.

Métodos não convencionais	Vantagens	Desvantagens
Extração com líquidos supercríticos (SFE)	<ul style="list-style-type: none"> - Tecnologia verde no caso da utilização de CO₂ como fluido com possibilidade de reutilização (sistema fechado com recirculação do CO₂); - Existe maior seletividade pois a solubilidade de um composto num fluido supercrítico pode ser manipulada por alteração da pressão e temperatura de trabalho; - A eliminação de CO₂ é conseguida sem resíduos, porque produz um extrato sem solventes; - O CO₂ pode ser recolhido e reutilizado para processos posteriores; - É um método adequado para a extração de compostos termolábeis. 	<ul style="list-style-type: none"> - Requer custos elevados para a compra do equipamento de alta pressão; - Para a extração de compostos polares requer a adição de um co-solvente polar (ex. etanol, metanol), pois ao ser usado unicamente o CO₂ (apolar) apenas se podem extrair compostos mais apolares; - Pode ser mais demorado do que as outras técnicas alternativas não convencionais
Extração com líquidos pressurizados (PLE)	<ul style="list-style-type: none"> - Tecnologia verde no caso da utilização da água pressurizada para a extração; - Redução do consumo de solventes tóxicos e perigosos para o ambiente. 	<ul style="list-style-type: none"> - Requer custos elevados para a compra do equipamento de alta pressão; - Quando as extrações são realizadas a altas temperaturas pode levar à degradação dos compostos termolábeis.
Extração por enzimas	<ul style="list-style-type: none"> - Tecnologia verde no caso da utilização de água; - O tratamento enzimático pode aumentar a recuperação de compostos bioativos devido à elevada seletividade das enzimas. 	<ul style="list-style-type: none"> - A eficiência da hidrólise enzimática pode ser baixa se os materiais vegetais apresentarem baixo teor de humidade; - A extração enzimática é um processo lento comparando com os restantes métodos não convencionais.

Os métodos não convencionais para além da redução dos tempos de extração e das quantidades de solventes perigosos utilizados, destacam-se por apresentarem melhores rendimentos de extração sendo assim possível a obtenção de extratos com melhor qualidade e com menores impactos ambientais. A desvantagem destes métodos é o facto de que a sua realização implica muitas das vezes custos mais elevados (por exemplo, na aquisição de equipamento específico), e por isso atualmente para a extração de compostos bioativos das algas marinhas, ainda é usual serem utilizados métodos de extração convencionais. Assim sendo, é importante que seja demonstrado através da investigação, que os métodos não convencionais podem ser considerados tecnologias verdes alternativas na medida em que são mais seguros, apresentam maior eficiência e são mais sustentáveis, e deste modo é essencial incentivar as indústrias na implementação destes métodos de modo a tornarem os seus processos mais sustentáveis. Para além disso, o desenvolvimento e utilização de métodos de extração sustentáveis é um fator importante para aumentar o valor acrescentado da indústria de algas marinhas a nível mundial (Matos et al., 2021; Meregalli, 2017).

Na Tabela 2 estão representados os métodos convencionais e não convencionais que têm vindo a ser usados na extração dos compostos bioativos e neuroprotetores presentes na alga marinha *U. pinnatifida*, tais como a fucoxantina, fucosterol, fucoídano, glicoproteínas e florotaninos juntamente com os métodos de separação ou purificação mais utilizados.

Tabela 2. Métodos de extração, separação e identificação dos compostos neuroprotetores (fucoxantina, fucoídano, fucosterol e glicoproteínas) presentes na alga marinha *U. pinnatifida*.

Composto	Método de extração	Métodos de separação/identificação	Referências
Fucoxantina	Extração por maceração	HPLC, HPLC-DAD, HPLC-UV	(Lourenço-Lopes et al., 2020)
	MAE		
	PLE		
	SFE		
Fucoídano	Extração com água quente	HPLC-DAD, HPLC-UV	(Zhao et al., 2018)
	Extração com ácido diluído		
	MAE		
	UAE		
Fucosterol	SFE	HPLC-DAD, HPLC-UV	(Grosso et al., 2015; X. H. Xiao et al., 2013)
	PLE		
	MAE		
	Extração Enzimática		
Glicoproteínas	Extração Enzimática	HPLC-DAD, HPLC-UV, SEC	(Gordalina et al., 2021)
	UAE		
	MAE		
	PLE		
Florotaninos	SFE	HPLC-DAD, HPLC-UV	(Gonçalves & Pedro, 2019)
	Extração com água quente		
	Extração com água: acetona (3:7 v/v)		

De entre todos os métodos de extração descritos, foi utilizada a extração assistida por micro-ondas (MAE), tendo em conta a disponibilidade de um extrator de micro-ondas no GRAQ.

2.4.2.1. Extração Assistida por Micro-ondas

A extração assistida por micro-ondas é apresentada na literatura através da sigla MAE proveniente do inglês “Microwave-assisted extraction”. Esta extração pode ser considerada uma técnica verde pelas pequenas quantidades de solventes necessários e pela baixa produção de resíduos (Delazar et al., 2012; Matos et al., 2021; Tsukui & Rezende, 2014).

A extração por este método ocorre como o nome indica através da irradiação de micro-ondas na matriz da amostra. A irradiação das micro-ondas provoca um aquecimento diretamente no interior da matriz através de colisões e fricções entre moléculas, ao contrário do que acontece durante o

aquecimento convencional no qual o material sofre aquecimento através de um gradiente de temperaturas, como se pode verificar na Figura 14. Assim sendo, o aquecimento através da irradiação de micro-ondas torna-se mais rápido do que o aquecimento convencional (Delazar et al., 2012; Matos et al., 2021; Tsukui & Rezende, 2014).

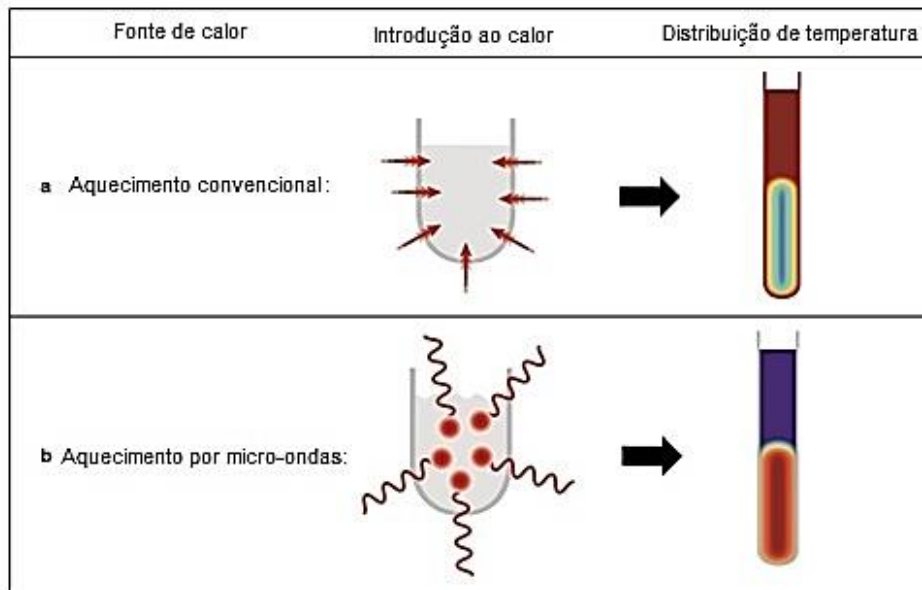


Figura 14. Comparação entre o aquecimento convencional (a) e o aquecimento por micro-ondas (b). Adaptado de (Titton, 2018).

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas e por isso a sua irradiação atua na faixa de frequência entre 0,3 a 300 GHz. A absorção destas ondas eletromagnéticas pode originar dois processos diferentes de aquecimento por micro-ondas, sendo eles a rotação dipolo e condução iónica. A rotação dipolo ocorre quando existe a interação da matriz da amostra com o campo elétrico, e baseia-se no alinhamento das frações dipolares da matriz da amostra com o campo elétrico criado pelas micro-ondas. Quando se retira o campo elétrico, as moléculas voltam ao seu estado desordenado, e a energia que foi absorvida durante a orientação nos dipolos é dissipada na forma de calor promovendo o aquecimento do meio envolvente. Este mecanismo de aquecimento está dependente do campo elétrico e do tempo necessário que os dipolos necessitam para voltarem ao seu estado inicial (estado de desordem). Assim sendo, se não existir tempo suficiente para a o realinhamento do dipolo com o campo eletromagnético aplicado, o aquecimento não ocorre. A condução iónica baseia-se no movimento dos iões carregados devido à influência do campo eletrostático criado pelas micro-ondas, estes movimentos criam fricção e geram calor promovendo o aquecimento do meio envolvente (Delazar et al., 2012; Matos et al., 2021; Tsukui & Rezende, 2014).

Para além disso, para um aquecimento eficiente através da irradiação por micro-ondas é necessário ter em conta as características do recipiente utilizado para a extração, uma vez que este deve ser permeável às micro-ondas e por isso deve ser constituído por materiais como o teflon ou quartzo. Estes materiais têm a capacidade de se manterem à temperatura próxima da temperatura ambiente após o aquecimento, sendo o recipiente transparente às micro-ondas e como mencionado anteriormente apenas a matriz da amostra que se encontra no interior é aquecida diretamente pelas micro-ondas (Delazar et al., 2012; Matos et al., 2021; Tsukui & Rezende, 2014).

O solvente utilizado na dissolução da amostra é também importante para que a extração por micro-ondas ocorra, isto porque o solvente escolhido depende da solubilidade do analito que se pretende extrair e por isso deve ter a capacidade de interagir com a matriz da amostra. Para além disso, deve ter

a capacidade de absorver a energia das micro-ondas e seguidamente convertê-la em calor. O rendimento da extração é diretamente proporcional ao tempo de extração, à potência da irradiação das micro-ondas e ao tamanho da matriz da amostra. Em relação ao tamanho da matriz, quanto menor forem as partículas, existe maior superfície de contacto entre o solvente e a matriz e melhor é a penetração da energia das micro-ondas que possibilita a obtenção de um melhor rendimento na extração do analito de interesse (Delazar et al., 2012; Matos et al., 2021; Tsukui & Rezende, 2014).

A MAE apresenta várias vantagens num processo de extração, tais como (Delazar et al., 2012; Matos et al., 2021; Tsukui & Rezende, 2014):

- Melhor eficiência da extração;
- Capacidade de aquecimento seletivo e direto na matriz da amostra;
- Melhor transferência de massa pela ação das micro-ondas na amostra;
- Menor tempo de extração necessário para extrair os analitos desejados;
- Menor consumo de energia;
- Menores gastos de solventes e utilização de solventes menos tóxicos;
- Elevada taxa de extração com obtenção de produtos com alta qualidade.

Devido às suas vantagens, a MAE pode ser utilizada para a extração de compostos bioativos tais como polissacarídeos, compostos fenólicos, antioxidantes, entre outros, presentes em algas marinhas. No entanto, devido à rápida geração de calor pela irradiação das micro-ondas, existem dificuldades na extração de compostos termolábeis tais como ácidos gordos, proteínas, pigmentos, entre outros. Para além disso, apresenta limitações que favorecem a escolha de métodos de extração convencionais, pois a aplicação desta tecnologia requer um capital inicial significativo, os custos dos equipamentos são mais elevados, é necessário existirem técnicos especializados para o manuseamento correto dos equipamentos, e é uma técnica em que é difícil realizar o scale-up de um nível laboratorial para um nível industrial (Delazar et al., 2012; Matos et al., 2021; Tsukui & Rezende, 2014).

2.4.3. Identificação e quantificação espectrofotométrica

A espectrofotometria UV-Vis é uma técnica muito utilizado a nível laboratorial, e permite a identificação e quantificação de diversos compostos orgânicos e inorgânicos, uma vez que é uma técnica robusta, apresenta baixo custo e apresenta uma instrumentação simples. Esta técnica baseia-se na medição da absorção de radiação eletromagnética nas regiões do espectro visível e ultravioleta pelas moléculas presentes em solução (Evans, 2022).

A análise espectrofotométrica pode ser usada para a determinação quantitativa da concentração de um determinado composto em solução, através do princípio da lei de Lambert-Beer, no qual existe uma relação direta entre a absorção da luz e a concentração da substância em solução. Mas também pode ser utilizada para a identificação de compostos presentes em solução, uma vez que alguns compostos apresentam uma coloração e absorvância máxima característica quando expostos a radiação eletromagnética, sendo possível assim a sua identificação e quantificação (Evans, 2022; Filho et al., 2010).

Os pigmentos das algas marinhas, os carotenoides e clorofilas, são um exemplo dos compostos que podem ser determinados espectrofotometricamente, através da medição de um extrato bruto da alga nos comprimentos de onda correspondentes à absorção máxima característica de cada pigmento, e posterior utilização dos valores de absorvância obtidos em equações desenvolvidas por Strickland e

Parsons relacionadas com os coeficientes de extinção molar de cada pigmento (Filho et al., 2010; Stengel, 2015).

As clorofilas são os pigmentos mais abundantes em plantas, mas também em algas, presentes nos cloroplastos e outros tecidos vegetais. Estes pigmentos são característicos por conferir a coloração das plantas e algas, e as colorações distintas que podem apresentar dependem da presença e distribuição de outros pigmentos associados tais como os carotenoides. Assim sendo, os pigmentos fotossintéticos e a sua abundância numa planta ou alga variam de acordo com a espécie. A clorofila *a* é o pigmento que se encontra presente em todos os organismos fotossintéticos, uma vez que é o pigmento utilizado para a realização da primeira etapa do processo fotossintético, sendo que os restantes pigmentos são apenas utilizados como auxílio na absorção da luz e na transferência de energia, sendo denominados de pigmentos acessórios. Os pigmentos acessórios são principalmente a clorofila *b*, que está presente em vegetais superiores, algas verdes e em algumas bactérias; a clorofila *c*, que está presente em algas castanhas e diatomáceas; e a clorofila *a*, que está presente em algas vermelhas (Maria Streit et al., 2005; Moreira, 2014).

Os carotenoides são outro tipo de pigmento que acompanha a presença de clorofilas, sendo também essenciais no processo de fotossíntese na medida em que conferem proteção às clorofilas em relação ao excesso de radiação prevenindo a foto-oxidação das mesmas. Estes podem ser também considerados pigmentos acessórios e podem apresentar coloração amarela, laranja e vermelha (Maria Streit et al., 2005; Moreira, 2014).

A *U. pinnatifida*, como referido anteriormente, é uma alga marinha da classe das algas castanhas (Rhodophyta), e por isso apresenta maioritariamente pigmentos como a clorofila *a*, *c* e carotenoides, que podem ser quantificados espectrofotometricamente. Para além destes compostos bioativos, os compostos fenólicos totais (TPC) presentes nesta alga marinha podem também ser quantificados espectrofotometricamente, neste caso não utilizando um extrato bruto da alga, mas através da realização de um método com o reagente de Folin-Ciocalteu que permite a obtenção de uma coloração azulada detetável a um comprimento de onda específico, no qual a intensidade da absorção da luz é proporcional à concentração de compostos fenólicos totais existentes no extrato. Assim sendo, a identificação e quantificação espectrofotométrica permitem avaliar o teor de compostos bioativos nos extratos obtidos após a extração, permitindo a obtenção e seleção de um ou mais extratos ricos em compostos bioativos (Apak et al., 2013; Maria Streit et al., 2005; Stengel, 2015).

2.4.4. Ensaios *in vitro* dos extratos obtidos

2.4.4.1. Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante dos compostos isolados da *U. pinnatifida* permite analisar a capacidade de cada um no controlo do stress oxidativo associado às doenças neurodegenerativas. No entanto, devido à diversidade química dos antioxidantes, torna-se difícil separar e quantificar os mesmos em amostras complexas, nos quais os efeitos sinérgicos de vários antioxidantes diferentes podem apresentar maior relevância, assim sendo, nestes casos é necessário avaliar a capacidade antioxidante total de cada extrato. Os ensaios para a avaliação da capacidade antioxidante total (TAC) de extratos podem dividir-se em (Apak et al., 2013; Apak et al., 2016):

- Ensaios baseados na transferência de átomos de hidrogénio (HAT), nos quais se mede a capacidade de um antioxidante para extinguir os radicais livres pela doação de um átomo de hidrogénio;

- Ensaio baseado na transferência de eletrões (ET), que medem a capacidade de um antioxidante na redução de um oxidante.

No entanto podem ainda existir métodos de avaliação da TAC que se baseiam simultaneamente em HAT e ET, os quais são considerados métodos de modo misto (Apak et al., 2013; Apak et al., 2016).

Neste trabalho foram utilizados os métodos de sequestro dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}, que são métodos baseados em HAT e ET (Apak et al., 2013).

Para além dos métodos HAT e ET mencionados, a atividade antioxidante total foi também quantificada através de métodos de sequestro de ROS/RNS tais como os métodos de sequestro de radicais superóxido, O₂^{•-}, do óxido nítrico, [•]NO, e do hidroxilo, [•]OH. A investigação sobre a atividade de sequestro dos radicais O₂^{•-}, [•]NO e de [•]OH pelos antioxidantes tem ganho um interesse crescente como sendo uma das formas mais importantes de clarificar o mecanismo da atividade antioxidante, uma vez que estes radicais são produzidos pelo organismo humano em processos oxidativos (Apak et al., 2013; Apak et al., 2016).

A atividade antioxidante foi apresentada em termos IC₅₀, na medida em que foi determinada a atividade inibitória dos extratos de *U. pinnatifida* em relação sequestro de 50 % dos radicais DPPH[•], ABTS^{•+}, O₂^{•-}, e [•]NO e [•]OH.

2.4.4.2. Avaliação da atividade enzimática

A atividade enzimática é determinada através da avaliação das reações que ocorrem entre uma determinada enzima e um determinado substrato, pois estas apresentam a capacidade de converter o substrato em produtos. Neste trabalho foram avaliadas as atividades inibitórias dos extratos de *U. pinnatifida* em relação às enzimas AChE, BuChE e tirosinase (Ingkaninan et al., 2003; Masuda et al., 2007).

Caso os extratos de *U. pinnatifida* apresentem a capacidade de inibir 50 % das enzimas como a AChE, BuChE e tirosinase, em concentrações similares à dos controlos positivos (na ordem dos microgramas ou nanogramas), pode referir-se que a *U. pinnatifida* pode ser utilizada no tratamento e prevenção de doenças neurodegenerativas. As moléculas do extrato competem com os substratos pela ligação do sítio ativo da enzima, e impedem que os neurotransmissores como a acetilcolina, butirilcolina e dopamina sejam degradados pelas enzimas (Ingkaninan et al., 2003; Masuda et al., 2007).

2.4.5. Ensaio *in vivo* dos extratos obtidos em embriões de peixe-zebra

O peixe-zebra (*Danio rerio*, Figura 15) é um peixe nativo do sudeste asiático, e tem-se tornado num organismo modelo, ou biomarcador, muito popular e utilizado nas pesquisas biomédicas. Inicialmente, este peixe ou os seus embriões, começaram por ser utilizados na monitorização da contaminação da água, de substâncias tóxicas, e da teratogénese (Stewart et al., 2014; X. Wang et al., 2021).



Figura 15. Peixe-zebra (*Danio rerio*) e os seus embriões e larvas (CIIMAR, 2017).

Este biomarcador apresenta diversas vantagens a nível experimental, uma vez que têm um tamanho corporal pequeno, facilidade de reprodução e manutenção, e também alta homologia fisiológica e genética com os mamíferos. Para além dessas vantagens, os seus embriões e larvas são transparentes o que facilita a manipulação ótica e a geração de imagens da atividade neural. O ciclo de desenvolvimento rápido do peixe-zebra e o seu grande número de desovas reduzem o tempo e o custo dos estudos experimentais e fornecem amostras suficientes para minimizar as diferenças entre os indivíduos. Devido à alta homologia fisiológica e genética com os mamíferos e o genoma humano, o peixe-zebra é um modelo muito importante e valioso para o estudo de doenças humanas, e assim este destaca-se por ser um modelo ideal para as ciências farmacêuticas, para a genética do desenvolvimento ou até outros campos (Stewart et al., 2014; X. Wang et al., 2021).

A estrutura organizacional do SNC do peixe-zebra é muito diferente da estrutura dos mamíferos ou humanos, no entanto, apresenta homologia com os mamíferos e humanos essencialmente através dos seus núcleos cerebrais tais como os gânglios de base, o corpo estriado, o hipocampo e a amígdala cerebelosa. O desenvolvimento do cérebro e a função neuroendócrina nos peixes-zebra e nos humanos também é muito semelhante. Para além disso, o peixe-zebra também apresenta um sistema neurotransmissor noradrenérgico, serotoninérgico, dopaminérgico e histaminérgico muito semelhante ao sistema neurotransmissor dos mamíferos. Por estes aspetos, o peixe-zebra foi validado como um modelo viável na investigação em doenças neurodegenerativas tais como DA, DP e também a depressão, na medida em que têm sido desenvolvidos cada vez mais métodos ou modelos rastreáveis de testes comportamentais e genéticos, importantes para a descoberta de novos medicamentos para o tratamento destas doenças (Stewart et al., 2014; X. Wang et al., 2021).

Neste trabalho, o peixe-zebra foi estudado apenas no seu nível embrionário e larvar e não a nível adulto, na medida em que se pretende o estudo da viabilidade, sobrevivência e desenvolvimento dos embriões e larvas através da ação dos extratos de *U. pinnatifida* obtidos. Na Figura 16 estão representados alguns dos estágios do desenvolvimento embrionário do peixe-zebra, em horas pós-fertilização (hpf).

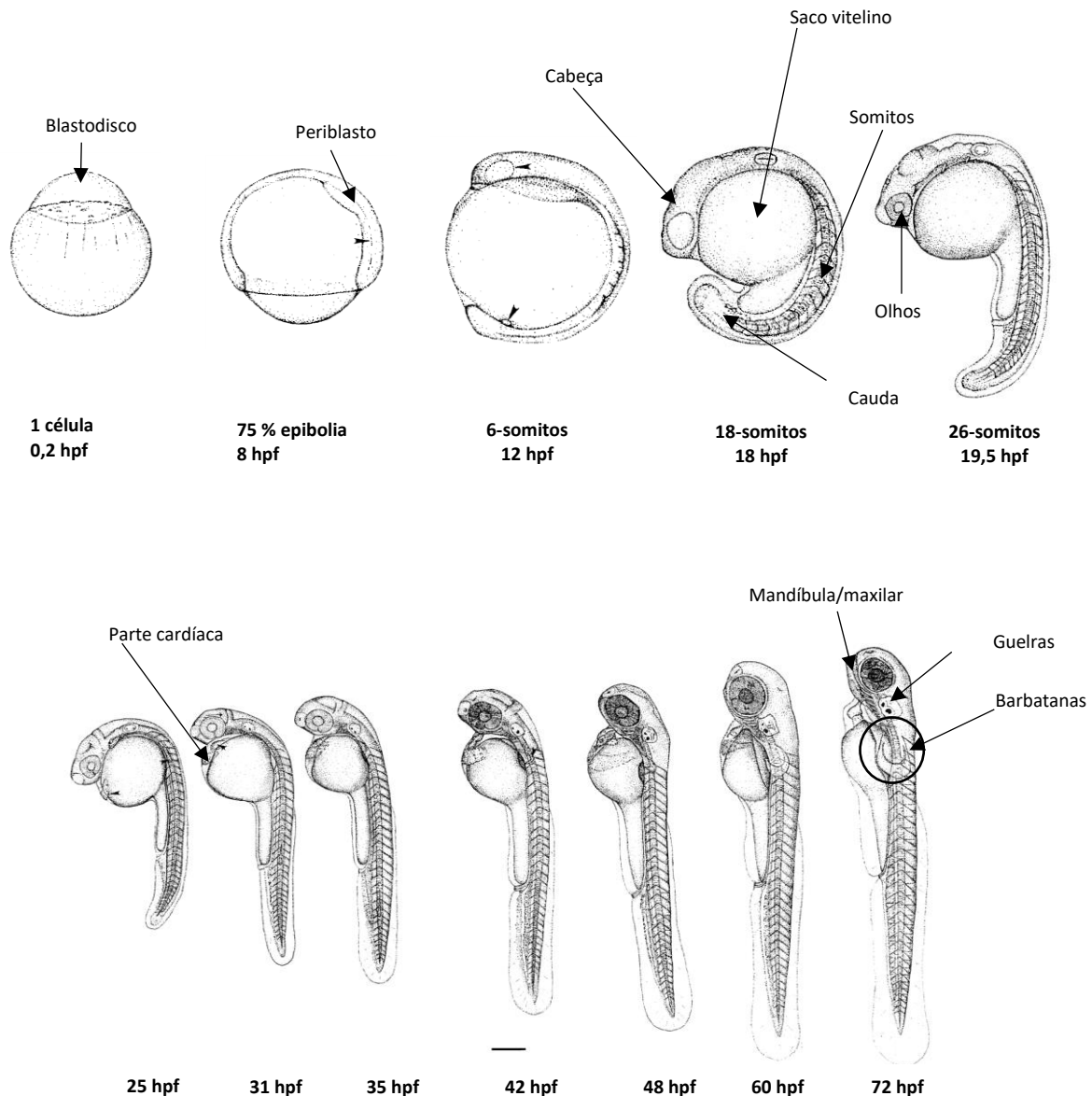


Figura 16. Estágios de desenvolvimento embrionário do peixe-zebra desde o estágio 1 célula (0,2 hpf) até às 72 hpf. Adaptado de (Kimmel et al., 1995).

A fase de zigoto ocorre logo após a fecundação, no qual há a formação do zigoto, que é constituído apenas por uma única célula. Esta fase dura até à ocorrência da primeira divisão mitótica. De seguida ocorre a fase de divisão que se inicia com a primeira divisão mitótica. Isto é, o ovo sofre várias divisões em apenas um polo do ovo, dando origem ao blastodisco que vai aumentando de tamanho, sem aumentar o tamanho do ovo, até atingir um total de 64 células (Kimmel et al., 1995; Raquel & Gomes, 2015).

A fase de blástula começa com a formação de 128 células do blastodisco, e caracteriza-se pelo aumento da duração do ciclo celular, perda das divisões sincronizadas e ocorre o início da mobilidade celular. Ou seja, os ciclos de divisão celular passam a ser assíncronos e com maior duração e a mobilidade celular permite o aumento do tamanho do ovo. Nesta fase, o blastodisco diminui de tamanho à medida que a quantidade de material do citoplasma aumenta, e forma-se assim uma camada sincicial protoplasmática denominada de periblasto (Kimmel et al., 1995; Raquel & Gomes, 2015).

Seguidamente ocorre a gastrulação que envolve três acontecimentos celulares, a epibolia, a involução e extensão convergente. Na medida em que há o ajuste do blastodisco no qual ocorre uma multiplicação celular mais rápida e as células vão se expandindo e envolvem todo o ovo a uma espessura constante. Nestas fases ocorre também o espessamento da periferia do blastodisco que se encontra mais achatado, e essa estrutura corresponde à extremidade posterior do embrião, em que uma das extremidades dará origem à cabeça e a outra à cauda, e a parte central corresponde ao saco vitelino no qual se formarão posteriormente os órgãos. A deformação do saco vitelino (formas não arredondadas) pode indicar a toxicidade presente no desenvolvimento (Kimmel et al., 1995; Raquel & Gomes, 2015).

A fase seguinte do desenvolvimento embrionário é designada de fase de segmentação, e ocorre entre as 10 e as 24 horas hpf, no qual ocorre o aparecimento do tubo neural e dos somitos que posteriormente são os responsáveis pela estrutura óssea do peixe-zebra. Esta fase dura até ao aparecimento de um número de 26 somitos, e começam também a ser visíveis alguns dos principais órgãos primários. Para além disso, é nesta fase que se inicia o destacamento da cauda e consequente alongamento e movimento do embrião. A alteração dos somitos é uma das alterações morfológicas mais representativas relacionadas com a toxicidade no desenvolvimento (Kimmel et al., 1995; Raquel & Gomes, 2015).

A fase de farínghula ocorre nas 48 hpf de desenvolvimento do peixe-zebra no qual ocorre a formação de arcos faríngeos que posteriormente darão origem à mandíbula e branquias. O alongamento do embrião continua, mas a um ritmo mais lento, e a cabeça é compactada, formam-se as barbatanas e começa a ocorrer a pigmentação. Nesta fase destaca-se também a formação do sistema circulatório e os batimentos cardíacos do coração começam a ser visíveis (Kimmel et al., 1995; Raquel & Gomes, 2015).

A última fase do desenvolvimento embrionário é a eclosão que pode ocorrer entre as 48 e as 72 hpf. Nesta fase, a morfogénese dos órgãos já é praticamente completa e ocorre o desenvolvimento rápido das barbatanas, maxilares e guelras. A eclosão precoce dos embriões antes da morfogénese dos órgãos pode estar relacionada com a toxicidade do meio de cultura dos peixes zebra (Kimmel et al., 1995; Raquel & Gomes, 2015).

Após as 72 hpf, ou seja, após a eclosão, as larvas começam a adaptar-se aos novos movimentos, colocam-se na posição natatória e podem nadar livremente. Se as larvas ainda não se encontrarem em posição natatória, mas sim na posição lateral (side-wise position) às 96 hpf, Figura 17, isto pode ser um indicador de toxicidade (Kimmel et al., 1995; Raquel & Gomes, 2015).

Para além disso, as larvas vão crescendo com o passar do tempo e a variação do tamanho das mesmas pode também indicar toxicidade pelo que segundo (Kimmel et al., 1995) entre as 72 e as 96 hpf, o tamanho das larvas de peixe-zebra pode variar entre 3,5 e 3,7 mm.

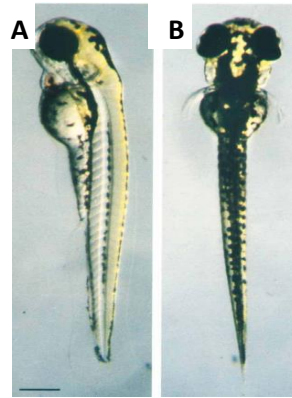


Figura 17. Desenvolvimento embrionário do peixe-zebra às 96 hpf, em posição lateral (side-wise position) (A) e em posição natatória (B). Adaptado de (Kimmel et al., 1995).

Podem ser utilizados modelos genéticos também ao nível embrionário, uma vez que os modelos comportamentais, como o nome indica, baseiam-se no comportamento do movimento dos peixes-zebra em resposta a fatores externos, e por isso, requerem um desenvolvimento mais avançado do que o nível embrionário. Os estudos comportamentais atualmente testados nos peixes-zebra foram primeiramente testados e realizados em ratos ou roedores, isto porque se tratam de mamíferos que apresentam células gliais, mais concretamente a microglia, muito semelhante à humana, o que significa que os efeitos das doenças neurodegenerativas observadas em humanos podem ser semelhantes nestes animais modelo, revelando assim a sua importância no estudo e investigação das doenças neurodegenerativas (Götz et al., 2018).

Assim sendo, existem testes semelhantes ou com o mesmo objetivo, realizados nos ratos e nos peixes-zebra, sendo que alguns desses testes estão apresentados na Tabela 3, na qual se evidencia alguns dos efeitos comportamentais estudados e os testes e os princípios dos mesmos utilizados tanto a nível dos peixes-zebra como a nível dos ratos ou roedores (Abreu et al., 2018; Q. Wang et al., 2017; X. Wang et al., 2021).

Tabela 3. Exemplos de alguns modelos ou testes utilizados para a avaliação comportamental dos peixes-zebra e ratos ou roedores, para o estudo de doenças neurodegenerativas.

MODELOS COMPORTAMENTAIS / FENOTÍPICOS				
Efeitos Comportamentais	Testes em Peixes-zebra	Testes em Ratos / roedores	Fenótipos de depressão ou ansiedade	Referências
Cognição e emoção	Avaliação da atividade locomotora (vertical ou horizontal) através da presença de uma fonte de luz infravermelha	Avaliação da variação do ritmo cardíaco e comportamento de congelamento, pela ação de estímulos aversivos e neutros	Animais com um fenótipo ansioso/depressivo têm períodos mais longos de congelamento, e uma maior incidência de congelamento antecipado em comparação com os controlos	(Abreu et al., 2018; Q. Wang et al., 2017; X. Wang et al., 2021)
Desespero comportamental aprendido	Teste de natação forçada – Os movimentos de	Teste de natação forçada avalia o desespero com	Animais com um comportamento mais depressivo	(Abreu et al., 2018; Q. Wang et al.,

MODELOS COMPORTAMENTAIS / FENOTÍPICOS

Efeitos Comportamentais	Testes em Peixes-zebra	Testes em Ratos / roedores	Fenótipos de depressão ou ansiedade	Referências
	<p>fuga dos peixes-zebra ou as suas larvas são influenciados por estímulos visuais, tácticos ou acústicos</p> <p>Teste de alterações luz-escuro – Os movimentos aumentam ou diminuem de acordo com as alterações de luz e escuridão</p>	<p>base na reação a um ambiente desagradável – tentativa de escapar;</p> <p>Teste de suspensão da cauda – importante para medir a resposta sobre a situação de stress</p>	<p>simplesmente flutuam sem tentarem escapar até ser resgatados;</p> <p>Animais com um comportamento mais depressivo, exibem um aumento no tempo de imobilidade</p>	<p>2017; X. Wang et al., 2021)</p>
Memória	<p>Teste de labirinto T/Y – A caracterização da memória através da utilização de estímulos, como alimento, para a concretização de um objetivo – resolução de labirintos</p>	<p>Teste de labirinto – a ansiedade é medida pelo seu comportamento através da quantidade de tempo que o roedor passa num sítio fechado e aberto</p>	<p>Animais com um comportamento não ansioso exploram o labirinto enquanto um ansioso fica escondido ou apenas espreita o seguimento do labirinto, não explora o labirinto</p>	<p>(Abreu et al., 2018; Q. Wang et al., 2017; X. Wang et al., 2021)</p>
Ansiedade e atividade locomotora	<p>Teste de mergulho num novo tanque – Avaliar a cognição de atividades locomotoras e exploratórias do peixe-zebra num novo tanque (ambiente diferente)</p>	<p>O teste de campo aberto – um roedor é colocado numa grande área circular ou recinto quadrado, permitido mover-se livremente</p>	<p>Animais com um comportamento não ansioso e não depressivos, exploram o centro do recinto mais do que um ansioso, que se vai agarrar às paredes ou simplesmente ficar num só lugar como por exemplo um canto</p>	<p>(Abreu et al., 2018; Q. Wang et al., 2017; X. Wang et al., 2021)</p>

Os testes apresentados na Tabela 3 servem essencialmente para avaliar os efeitos comportamentais relativos à depressão, na medida em que os ratos ou peixes-zebra variam os seus comportamentos em relação a estímulos dependendo do estado de ansiedade ou depressão, sendo que quando apresentam esses estados, apresentam atitudes apáticas e com pouca reação aos estímulos. No entanto é importante referir que um diagnóstico de depressão em testes em animais, não pode ser feito em apenas um único teste, no entanto a combinação de vários testes para a avaliação de vários comportamentos depressivos, ansiosos, e de desespero e anedonia, podem ser utilizados para avaliar a ocorrência e a gravidade da depressão. E, com estas avaliações, existe a capacidade de estudar diferentes aspetos da depressão de forma a aprofundar o seu conhecimento e tratamento como um todo (Abreu et al., 2018; X. Wang et al., 2021).

Como referido anteriormente, para além dos modelos comportamentais, existem também os modelos genéticos nos quais neste caso são utilizados peixes-zebra no qual são feitas alterações a nível genético de modo a torná-los modelos para o estudo de doenças neurodegenerativas. Alguns dos modelos genéticos que podem ser realizados tanto em peixes-zebra como em ratos ou roedores, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Exemplos de alguns modelos genéticos dos peixes-zebra e ratos ou roedores, para o estudo de doenças neurodegenerativas.

MODELOS GENÉTICOS				
Modelos	Testes em Peixes-zebra	Testes em Ratos / roedores	Doenças em estudo e princípios	Referências
Desenvolvimento de placas Aβ	Microinjeção cerebroventricular de A β em embriões de peixe-zebra	Uso de transgenes para a expressão da mutação da glicoproteína transmembranar do tipo I, da família <i>APP</i> V717F (Indiana) sob o fator - β promotor do crescimento (geração de placas A β)	A obtenção de modelos animais para o estudo da DA, mais concretamente no estudo da acumulação de placas A β	(Götz et al., 2018; Newman et al., 2014; X. Wang et al., 2021)
Produção de fatores neurotróficos (NTFs) pela proteína tau	Mutações no gene codificador de tau MAPT (tau proteico associado a microtúbulos), como o Tau-P301L e Tau-A152T	Expressão da mutação familiar FTLT MAPT P301L sob o controlo do promotor do prião do rato ou com promotor Thy1.2 humano	Os modelos transgénicos destes animais permitem imitar as principais características da hiperfosforilação da proteína tau que é característica da DA	(Götz et al., 2018; Newman et al., 2014; X. Wang et al., 2021)

MODELOS GENÉTICOS				
Modelos	Testes em Peixes-zebra	Testes em Ratos / roedores	Doenças em estudo e princípios	Referências
Diminuição da 5-HT	Alteração da expressão de htr1aa, -ab, -bd, que são recetores de 5-HT	Expressão da Tph1 e Tph2, codificante da enzima triptofano hidroxilase, enzima limitante da biossíntese de 5-HT	Os animais modelo permitem avaliar os níveis de 5-HT, que em valores baixos levam ao aparecimento da depressão	(Abreu et al., 2018; Q. Wang et al., 2017; X. Wang et al., 2021)

NOTA: APP (V717F) – mutação da proteína β -amioide pela substituição da valina pela fenilalanina no codão 717; FTL D MAPT P301L – Demência causada pela mutação P301L (substituição da prolina pela leucina no codão 301) no gene MAPT da proteína tau associada ao microtúbulo; Thy1.2 – gene promotor de uma glicoproteína de membrana; Tau P301L – mutação pela substituição da prolina pela leucina no codão 301 da proteína tau; Tau A152T – mutação pela substituição da alanina pela treonina no codão 152 da proteína tau; Tph1 – gene promotor da triptofano hidroxilase 1; Tph2 – gene promotor da triptofano hidroxilase 2.

Os modelos apresentados na Tabela 4 têm como objetivo induzir alterações nos peixes-zebra e/ou ratos ou outros roedores de modo que estes apresentem características das doenças neurodegenerativas para que posteriormente possam ser estudados com a utilização de medicamentos para o tratamento dessas doenças de modo a verificar o seu efeito neuroprotetor.

Nas Tabela 3 e Tabela 4, são apresentados testes comportamentais e genéticos tanto para os peixes-zebra como para os ratos ou roedores, no entanto quando se comparam entre si, os estudos com os peixes-zebra apresentam várias vantagens em relação à utilização de animais modelo como ratos ou roedores (Saleem & Kannan, 2018). Estas vantagens podem ser:

- Os habitats dos peixes-zebra são mais simples e por isso existe uma maior facilidade da manutenção dos mesmos a nível laboratorial, comparativamente às condições que seriam necessárias para a manutenção de mamíferos. Para além disso, como já referido, o peixe-zebra apresenta tempos de geração curtos de 3 a 5 meses o que por sua vez aumenta a taxa de progresso experimental;
- A fecundação do peixe-zebra é externa e apresenta um padrão de desenvolvimento que facilita a observação e manipulação dos embriões, que por sua vez podem apresentar valores de 200 a 300 embriões por cada peixe, possibilitando assim um grande fornecimento de animais para os estudos;
- A clareza ótica, como já referido é uma das vantagens exclusivas dos embriões de peixe-zebra que permite a visualização de genes individuais marcados fluorescentemente, utilizando técnicas de imagem não invasivas, facilitando manipulações genéticas;
- Os embriões do peixe-zebra são facilmente manipuláveis geneticamente por mRNA, transgenes e técnicas de edição do genoma;
- Por fim, como já referido, o peixe-zebra apresenta uma função neuroendócrina e um sistema neurotransmissor muito semelhante aos humanos.

Assim sendo, devido às várias vantagens dos peixes-zebra em relação aos ratos ou roedores, é possível referir que o peixe-zebra representa um sistema modelo potencial para o estudo de doenças neurodegenerativas (Saleem & Kannan, 2018).

Para a concretização dos objetivos propostos, ou seja, estudar a bioatividade de extratos da alga marinha *U. pinnatifida* a nível das suas propriedades antioxidantes e na inibição de enzimas do SNC, realizaram-se extrações convencionais de modo a otimizar a extração dos compostos bioativos presentes na macroalga *U. pinnatifida*, seguindo-se uma extração com os parâmetros otimizados pela técnica de MAE. Com este extrato otimizado, quantificaram-se os compostos fenólicos, os carotenoides e as clorofilas totais. Seguidamente, a fim de se avaliar a atividade antioxidante total, foram utilizados os métodos de sequestro dos radicais DPPH^{*}, ABTS⁺, O₂⁻, NO e OH^{*}, e a nível da atividade neuroprotetora através da avaliação da inibição de enzimas como a acetilcolinesterase, butirilcolinesterase e tirosinase. Por fim, foi avaliada a toxicidade dos extratos *in vivo* através da realização de ensaios de desenvolvimento embrionário do peixe-zebra.

Capítulo 3 – Descrição das atividades desenvolvidas: Metodologia

3.1. Reagentes e Materiais

Cloreto de sódio (NaCl), cloreto de magnésio hexa-hidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), metanol (CH_3OH) foram obtidos na VWR (Leuven, Bélgica e Gliwice, Polónia). Acetona (C_3H_6O), cloridrato de tris (hidroximetil) aminometano (Tris-HCl), albumina de soro bovino (BSA), acetilcolinesterase (AChE) de *Electrophorus electricus*, butirilcolinesterase (BuChE) de soro de equino, iodeto de acetiltiocolina (ATCI), iodeto de S-butirilcolina (BTCl), ácido 5,5'-ditio-bis- (2-nitrobenzoico) (DTNB), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), fosfato de potássio dibásico tri-hidratado ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$), nitroprussiato de sódio di-hidratado (SNP), sulfanilamida, N-(1-Naftil) etilenodiamina dicloridato (NED), ácido orto-fosfórico 85%, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), ácido 6- hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), 2,2'-azino-bis (3- etilbenzotiazolina-6- ácido sulfónico) (ABTS), persulfato de potássio ($K_2O_8S_2$), carbonato de sódio (Na_2CO_3), reagente de Folin-Ciocalteu, ácido gálico, ácido salicílico, sulfato de ferro heptaidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), fosfato dissódico (Na_2PO_4), 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA) e a tirosinase de cogumelo foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA e Steinheim, Alemanha). Etanol (C_2H_5OH) e diclorometano (CH_2Cl_2) foram adquiridos na Carlo Erba (Val de Reuil, França). A água ultrapura (com resistividade de 18,2 M Ω .cm a 25°C oi produzida pelo Sistema Simplicity 185 (Millipore, Molsheim, França).

3.2. Preparação das amostras

As amostras da alga marinha *U. pinnatifida* utilizadas foram provenientes da empresa Algamar sob a forma desidratada, com uma humidade média de 10,02 %. A humidade média foi obtida experimentalmente em triplicado através da utilização da técnica termogravimétrica, com a utilização de um analisador termogravimétrico da Kern modelo DAB 100-3 (Balingen, Germany).

Após a determinação da humidade média, as amostras de *U. pinnatifida* foram hidratadas com água salgada, com uma concentração de 35 g/L de NaCl durante 5 minutos. No final desse período, a alga foi retirada do contacto com a água salgada e lavada com água desionizada durante o mesmo período de tempo, de forma a eliminar o excesso de sal. Seguidamente, as amostras da alga marinha foram desidratadas num desidratador de alimentos da marca Excalibur, modelo 4926T (Dublin, Ireland). O processo de desidratação da *U. pinnatifida* decorreu durante 14 horas a uma temperatura de 41 °C, e no final, as amostras desidratadas foram trituradas numa picadora Moulinex A320 (Caen, França). As partículas obtidas foram peneiradas de modo a serem homogeneizadas granulometricamente. Para as extrações apenas as partículas com um tamanho compreendido entre 1-2 mm foram selecionadas.

3.2. Extração dos compostos bioativos antioxidantes

As condições ótimas de extração dos compostos bioativos foram determinadas previamente por uma série de extrações convencionais que permitissem a obtenção de melhores rendimentos e

concentrações mais elevadas de compostos fenólicos e carotenoides, antes aplicar a técnica de MAE. Assim sendo, para a otimização das extracções foram usadas diferentes condições tais como: o tipo de solvente (etanol, metanol, acetona e diclorometano, e mistura de solventes como a água: acetona (10:90, v/v), água: etanol (50:50, v/v) e água: metanol (50:50, v/v)), razão sólido: solvente (1:10 e 1:20, g/mL), tempos de extração (1h e 2h), e temperaturas de extração (25 °C e 40 °C). De forma a avaliar a eficiência de extração foram analisados os teores de carotenoides, clorofilas e de fenólicos totais. Após a análise dos resultados obtidos com as condições anteriores, foi necessário realizar novas extracções convencionais com a mistura de solventes água: acetona (10:90, v/v), água: etanol (50:50, v/v) nas razões sólido: solvente de 1:40 g:mL, para tempos de extração de 1h e para a temperatura de extração de 40 °C. Para as extracções por MAE foram usadas as mesmas condições de razão sólido: solvente e temperatura, mas a um tempo de extração de 30 min usando as duas misturas de solvente.

3.2.1. Extracções Convencionais

Para a realização das extracções convencionais foram pesados cerca de 1,0 g de *U. pinnatifida* para balões de Erlenmeyer. Seguidamente foram adicionados 5,0 mL de água desionizada deixando a amostra absorver a água adicionada durante um período de 6 minutos. Este passo de hidratação prévia foi realizado de acordo com X. Xiao et al., 2012 e permite aumentar a área de contacto entre a matriz e o solvente ao aumentar o tamanho das partículas da alga pela absorção da água. Para além disso, no caso do MAE, as propriedades de absorção da radiação micro-ondas da amostra seca aumentam após a hidratação. Após o período de 6 minutos, foram adicionados os solventes ou mistura de solventes nas diferentes razões, temperaturas e tempos de extração mencionados anteriormente, com agitação constante de modo a extrair os compostos fenólicos e carotenoides.

Após as extracções, os extratos foram filtrados e o solvente evaporado através da utilização do rotavapor (Buchi, Flawil, Switzerland). Os extratos secos obtidos foram colocados em contacto com um fluxo de nitrogénio de modo a garantir a secagem completa, e posteriormente colocados num exsiccador até massa constante. O rendimento de extração foi calculado através da seguinte equação (1).

$$\text{Rendimento da Extração (\%)} = \frac{\text{massa final do extrato seco obtido após a extração}}{\text{massa inicial de alga utilizada na extração}} \times 100 \quad (\text{equação 1})$$

3.2.2. Extração Assistida por Micro-ondas (MAE)

A MAE foi realizada com as condições otimizadas descritas anteriormente: tempo (30 min), razão sólido: solvente (1:40 g:mL), temperatura (40 °C) e como solventes água: etanol (50:50 v/v) e água: acetona (10:90 v/v).

A MAE foi realizada com um carrossel de 14 vasos de extração de politetrafluoretileno (PTFE) no equipamento MARS-X 1500W (Sistema de Reação Acelerada por Micro-ondas para Extração e Digestão, CEM, Mathews, NC, USA). A temperatura e pressão foram controladas por sensores, sendo que para a temperatura foi usado um sensor Probe RTP – 300 Plus, $\pm 3^{\circ}\text{C}$, e para a pressão foi usado um sensor ESP 1500 Plus; ± 10 psi ambos da CEM.

Como a MAE foi realizada com a razão sólido: solvente de 1:40, foram pesados 0,5 g de amostra para cada vaso de extração no qual posteriormente foram adicionados 5 mL de água ultrapura de modo

a possibilitar a hidratação da amostra, que decorreu durante 5 minutos. No final desse intervalo de tempo, foram adicionados 20 mL da mistura de solventes relativa a cada extração. A Tabela 5 apresenta as condições operacionais selecionadas no equipamento de MAE de acordo com as condições selecionadas para as extrações.

Tabela 5. Condições usadas para a MAE, para o tempo de 30 min, razão sólido:solvente de 1:40 g:mL, e temperaturas de 40 °C, para 14 vasos de extração.

Potência		Rampa	Pressão	Temperatura	Agitação	Extração
Máxima (W)	%	min	PSI	°C	-	min
1200	100	5:00	150	40	2	30:00

No final da MAE, os extratos foram filtrados, evaporados e secos tal como descrito para a extração convencional. O rendimento da extração foi calculado a partir de Equação 1.

Numa primeira fase foram testadas as atividades antioxidantes e inibitórias de todos os extratos obtidos na MAE (extratos obtidos das extrações com água: etanol (50:50 v/v) e água: acetona (10:90 v/v)), no entanto perante a grande dificuldade de dissolução do extrato seco obtido da extração de água: acetona (10:90, v/v), este apenas foi utilizado para a determinação do TPC e do conteúdo de clorofilas e carotenoides, sendo posteriormente excluído dos restantes ensaios realizados para a determinação da atividade antioxidante e inibitória de enzimas importantes para o estudo das doenças neurodegenerativas.

3.3. Ensaios *in vitro*: Avaliação da atividade antioxidante

3.3.1. Quantificação do Conteúdo Fenólico Total (TPC)

A quantificação do conteúdo fenólico total foi realizada através de um método colorimétrico com o reagente de Folin-Ciocalteu, que como referido anteriormente permite a avaliação do total de compostos presentes nos extratos com capacidade redutora pela formação de um complexo composto por ácidos de tungsténio e molibdénio com coloração azulada detetável a 765 nm, no qual a intensidade da absorção da luz neste comprimento de onda é proporcional à concentração de compostos fenólicos. No entanto, este método por ter de base uma reação de oxidação/redução pode existir a possibilidade da quantificação de compostos interferentes facilmente oxidáveis tais como o ácido ascórbico, proteínas e açúcares que podem também ser detetados através desta metodologia, conduzindo à possível presença de erros na determinação dos compostos fenólicos totais. Apesar disso, a utilização de outros métodos possíveis para a quantificação do conteúdo fenólico total, tais como a titulação com permanganato de potássio e análises por colorimetria com sais de ferro, apresentam também as suas limitações, nomeadamente, a oxidação com o permanganato de potássio é mais difícil de padronizar e está sujeito a maiores interferências, particularmente dos açúcares, e na colorimetria com sais de ferro os monofenóis geralmente não reagem e, em algumas condições, os difenóis vicinais e os trifenóis vicinais dão origem a cores diferentes. Assim sendo, de entre os possíveis métodos para a determinação do TPC, o método de Folin-Ciocalteu é preferivelmente utilizado (Apak et al., 2013, 1999; Soares, 2015).

Para esta análise, os extratos secos foram dissolvidos em metanol, com uma concentração de 50 mg/mL, no entanto em alguns dos casos, tal não foi possível, por motivos de solubilidade, resultando numa concentração de 25 mg/mL. Estas soluções foram diluídas 1; 2; 5; 10; 50 e 100 vezes.

Como padrão foi usada uma solução de ácido gálgico com uma concentração de 200 mg/L guardada ao abrigo da luz. A partir dessa solução foram preparados, 6 padrões com concentrações entre os 10 e os 200 mg/L.

A leitura dos resultados foi realizada num leitor de microplacas de 96 poços, no qual cada padrão, amostra e branco foram lidos em triplicado. Nos respetivos poços colocaram-se 25 µL de metanol como branco, padrões e amostras seguidos de 75 µL de água ultrapura, 25 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (mistura com água 1:1 guardada ao abrigo da luz) e 100 µL da solução Na₂CO₃ (75 g/L).

+Na Figura 18 está representado o esquema de aplicação dos brancos, padrões e amostras na microplaca, em que os primeiros 3 poços corresponderam ao branco, os seguintes de A4 a B9 corresponderam aos padrões, e os restantes poços (B10 a H9) foram usados para colocar as amostras.

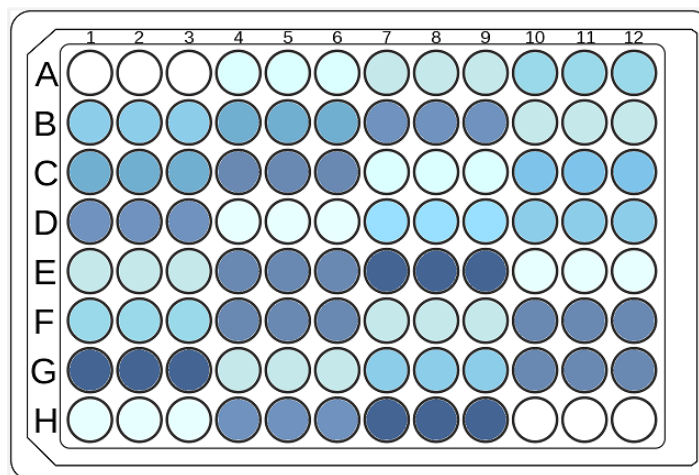


Figura 18. Representação esquemática da microplaca usada para a determinação do TPC. Legenda: A1-A3: brancos; A4-B9: padrões em triplicado com as respetivas concentrações (200, 150, 100, 50, 25 e 10 µL/mL); B10-H9: amostras em triplicado desde a mais concentrada à mais diluída.

Após a adição do reagente de Folin-Ciocalteu, foi necessário que a mistura de cada poço repousasse durante um período de 6 minutos, ao abrigo da luz, e só posteriormente foi adicionado o Na₂CO₃, seguido de um período de repouso de 90 minutos ao abrigo da luz. No final desse período, foi lida a absorvância a 765 nm num leitor de microplacas multimodo Synergy HT, BioTek Instruments (Winooski, VT, USA), com o software Gen5 2.0. Os resultados obtidos foram expressos em mg equivalentes de ácido gálgico (GAE)/ g extrato seco.

3.3.2. Quantificação do conteúdo de carotenoides totais e clorofilas a, c e totais

Tal como os compostos fenólicos, os carotenoides e as clorofilas apresentam também atividade antioxidante, e a sua quantificação foi feita de acordo com Stengel, 2015, através da medição da coloração de cada amostra, usando espectrofotometria para a medição da absorvância.

Para a quantificação do conteúdo de carotenoides foi também utilizada uma microplaca de 96 poços, usando 150 µL de metanol como branco, e 150 µL da respetiva amostra. Nesta análise, as amostras encontravam-se dissolvidas em metanol (50 mg/mL), tal como no caso das análises do TPC.

Tanto o branco como as amostras foram preparadas e lidas em triplicado. Os espetros das amostras e dos brancos foram traçados no intervalo de comprimentos de onda de 300 a 800 nm num leitor de microplacas. As absorvâncias lidas a cada comprimento de onda permitiram a obtenção da concentração de carotenoides e clorofilas *a* e *c* presentes nas amostras através das equações 2-5 (Stengel, 2015):

$$\text{Clorofila } a (\mu\text{g/mL}) = -2,0780 \times (A_{632} - A_{750}) - 6,5079 \times (A_{652} - A_{750}) + 16,2127 \times (A_{665} - A_{750}) - 2,1372 \times (A_{696} - A_{750}) \quad \text{(equação 2)}$$

$$\text{Clorofila } c (\mu\text{g/mL}) = 34,0115 \times (A_{632} - A_{750}) - 12,7873 \times (A_{652} - A_{750}) - 1,4489 \times (A_{665} - A_{750}) - 2,5812 \times (A_{696} - A_{750}) \quad \text{(equação 3)}$$

$$\text{Clorofilas Totais } (\mu\text{g/mL}) = 28,6473 \times (A_{632} - A_{750}) + 12,9405 \times (A_{652} - A_{750}) + 0,6845 \times (A_{665} - A_{750}) + 5,2230 \times (A_{696} - A_{750}) \quad \text{(equação 4)}$$

$$\text{Carotenoides } (\mu\text{g/mL}) = 4 \times (A_{480} - A_{750}) \quad \text{(equação 5)}$$

3.3.3. Quantificação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH^{*}

O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos dos antioxidantes, e o DPPH^{*} é um radical livre que pode ser utilizado para a avaliação da atividade antioxidante dos extratos através da medição da absorvância a 517 nm. Quando o eletrão desemparelhado do DPPH^{*} recebe um átomo de hidrogénio proveniente dos compostos antioxidantes ocorre uma mudança de cor (azul-violeta → amarelo-claro), e a intensidade de absorção diminui, ou seja, quanto maior o número de radicais livres reduzidos pelo antioxidante, menor é a absorvância medida a 517 nm. Este método é muito utilizado na avaliação da atividade antioxidante pois é um método rápido, prático e com boa estabilidade. Os resultados obtidos podem ser equiparados ao Trolox que é um antioxidante sintético utilizado como padrão submetido às mesmas condições dos extratos, e posteriormente expressos em quantidades equivalentes a Trolox (TEAC) ou em termos de IC₅₀ (concentração que inibe 50 % do radical) (Barbosa et al., 2011; Marxen et al., 2007; M. O. S. Pereira, 2010; Sucupira et al., 2012).

Para a realização do método de sequestro do radical DPPH^{*} preparou-se o reagente DPPH com uma concentração de 0,1 mmol/L em etanol previamente protegido da luz. Esta solução foi preparada diariamente para cada ensaio, uma vez que a mesma não se mantém estável com o armazenamento.

O extrato de *U. pinnatifida* foi dissolvido em etanol com uma concentração de 25 mg/mL, que serviu como base para a preparação de diferentes diluições (2, 5, 10 e 50 vezes), ou seja, concentrações de 25,0; 12,5; 5,0; 2,5 e 0,50 mg/mL de extrato, respetivamente.

Por fim, foram colocados todos os reagentes na microplaca, de acordo com a Figura 19, em que foram colocadas as diferentes diluições do extrato nas linhas A a E, num volume de 25 µL, e seguidamente adicionados 200 µL de DPPH nos poços das colunas de 1-3, 5-7 e 9-11. As restantes colunas corresponderam ao branco da amostra, o que significa que apenas continha 25 µL de cada diluição do extrato juntamente com 200 µL de etanol. A linha H correspondeu ao controlo negativo, o qual continha 25 µL de etanol a substituir o volume de extrato dos restantes poços, e 200 µL de DPPH. No final, cada poço da microplaca apresentava um volume de 225 µL, sendo que as concentrações testadas no volume reacional foram de 2,78; 1,39; 0,556; 0,278 e 0,0556 mg/mL. Antes da leitura a 517 nm a microplaca foi incubada durante 30 minutos no escuro.

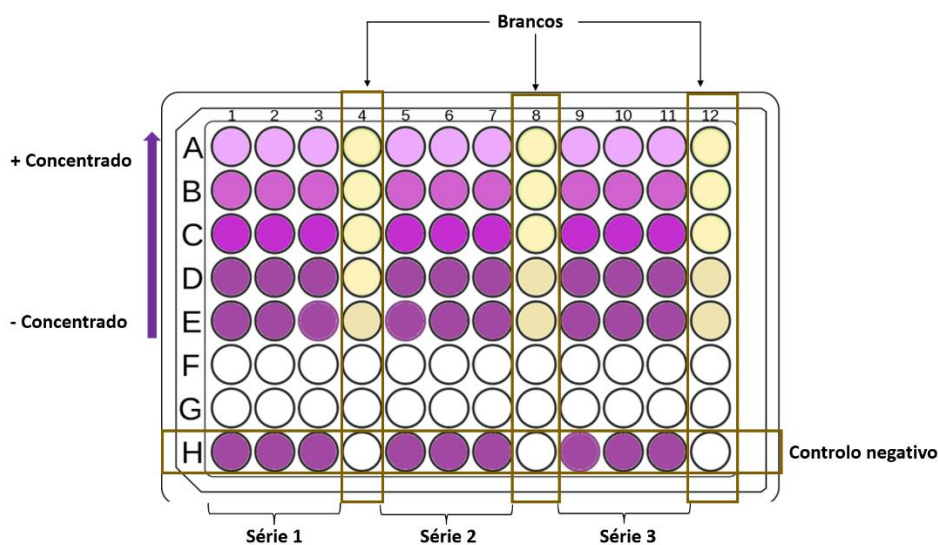


Figura 19. Representação esquemática da microplaca usada para o bioensaio de sequestro do radical DPPH'.
Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra – etanol a substituir a amostra), Linhas A-E: Amostra mais concentrada à menos concentrada (2,78; 1,39; 0,556; 0,278; 0,0556 mg/mL no poço). As colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco e não contêm o DPPH', apenas contêm 25 µL de amostra e 200 µL de etanol.

No final, os resultados foram lidos no leitor de microplacas multimodo Synergy HT, BioTek Instruments, com o software Gen5 2.0, a um comprimento de onda de 517 nm. O software Gen5 2.0 permitiu a obtenção dos valores de absorvâncias (Abs) do controlo, dos brancos e das amostras e através da equação 6 calcularam-se as percentagens de sequestro de DPPH'.

$$\% \text{ sequestro} = \frac{(Abs_{\text{controlo}} - Abs_{\text{branco controlo}}) - (Abs_{\text{amostra}} - Abs_{\text{branco amostra}})}{(Abs_{\text{controlo}} - Abs_{\text{branco controlo}})} \times 100 \quad \text{(equação 6)}$$

3.3.4. Quantificação da atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS^{•+}

O método de sequestro de ABTS^{•+}, tal como o método de sequestro de DPPH', é baseado na captura ou sequestro do radical do ABTS^{•+} pelos compostos antioxidantes, numa solução em que os extratos são colocados em contacto com o radical ABTS^{•+}. O sequestro dos radicais livres pelos

compostos antioxidantes provoca uma diminuição da absorvância que pode ser lida a 645, 734 e 815 nm. No entanto recomenda-se a leitura da absorvância a 734 nm uma vez que há menos interferências de pigmentos vegetais. A redução do radical ABTS^{•+} em ABTS provoca também perda de cor na solução. Os resultados obtidos podem ser equiparados ao Trolox que é um antioxidante sintético utilizado como padrão submetido às mesmas condições dos extratos, e posteriormente expressos em quantidades equivalentes a Trolox (TEAC) ou em termos de IC₅₀ (concentração que inibe 50 % do radical) (Barbosa et al., 2011; M. O. S. Pereira, 2010; Sucupira et al., 2012).

Para a realização do método de sequestro do radical ABTS^{•+} foi necessário a preparação da solução aquosa de ABTS concentrada, com uma concentração de 7 mM, e uma solução aquosa de persulfato de potássio a 2,45 mM. Seguidamente procedeu-se à mistura das duas soluções previamente preparadas, a qual foi armazenada protegida da luz à temperatura ambiente durante 16 horas até ser possível a sua utilização em ensaios.

Após as 16 horas, foi preparada uma solução de ABTS^{•+} diluída, com valores de absorvância entre 0,680 – 0,720 nm. Caso os valores lidos apresentassem absorvâncias superiores a 0,720 nm, a solução de ABTS de trabalho deveria ser diluída novamente com água ultrapura, ou caso contrário, deveria ser concentrada com a solução padrão de ABTS preparada primeiramente, de modo a respeitar o intervalo de absorvâncias recomendado.

Seguidamente, foram preparadas diluições do extrato de *U. pinnatifida*, dissolvido em etanol tal como descrito para o sequestro do DPPH[•].

Por fim, foram colocados todos os reagentes na microplaca, de acordo com a Figura 20, usando 20 µL de amostra, seguidos de 180 µL de ABTS^{•+} nos poços das colunas de 1-3, 5-7 e 9-11. As restantes colunas corresponderam ao branco da amostra, o que significa que apenas continham os 20 µL de cada diluição do extrato juntamente com 180 µL de etanol. A linha H correspondeu ao controlo negativo o qual apresentava 20 µL de etanol a substituir o volume de extrato dos restantes poços, e 180 µL de ABTS^{•+}. No final, cada poço da microplaca apresentava um volume de 200 µL, sendo que em termos de concentrações por poço, apresentaram valores de 5,0; 2,5; 1,0; 0,50 e 0,10 mg/mL. Após ser colocado o reagente ABTS^{•+}, a microplaca ficou a incubar durante 6 minutos no escuro antes da leitura das absorvâncias.

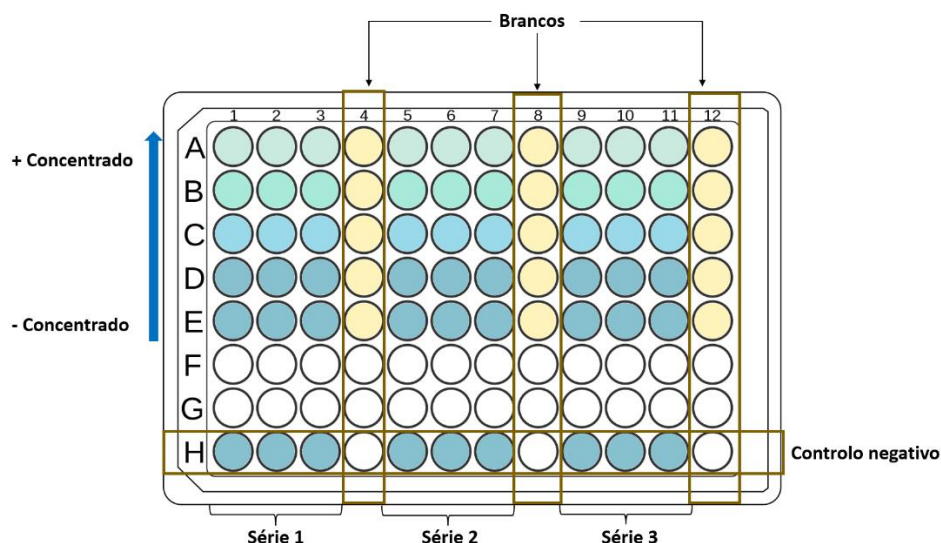


Figura 20. Representação esquemática da microplaca usada para o bioensaio de sequestro do radical ABTS^{•+}.
Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra – etanol a substituir a amostra), Linhas A-E: Amostra mais

concentrada à menos concentrada (5,0; 2,5; 1,0; 0,50; 0,10 mg/mL no poço). As colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco da amostra e não contêm o ABTS⁺, apenas contêm 20 µL de amostra e 180 µL de etanol.

No final, os resultados foram lidos no leitor de microplacas multimodo Synergy HT, BioTek Instruments, com o software Gen5 2.0, a um comprimento de onda de 734 nm. O software Gen5 2.0 permitiu a obtenção dos valores de absorvâncias (Abs) do controlo, dos brancos e das amostras e para o cálculo de % de sequestro de radicais ABTS⁺ usou-se a equação 6.

3.3.5. Avaliação do sequestro do radical óxido nítrico (•NO)

A metodologia utilizada para a avaliação do sequestro do radical •NO envolve o reagente nitroprussiato de sódio (SNP), que em solução aquosa a pH fisiológico é responsável por gerar espontaneamente o •NO. O •NO gerado interage posteriormente com o oxigénio, de acordo com a equação 7, e ocorre a produção de nitrito, que pode ser quantificado através da reação com o reagente de Griess. O método de Griess não mede diretamente a concentração de •NO, mede a concentração de NO₂⁻, que é um dos principais produtos da oxidação do •NO num tampão de fosfato de sódio com oxigénio (Apak et al., 2013; Apak et al., 2016).



Durante a reação com o reagente de Griess, ocorre diazotização entre o nitrito e sulfanilamida e subsequente ligação com naftil-etilenodiamina, no qual existe a produção de um cromóforo rosa que pode ser quantificado a 560 nm. Caso exista uma molécula capaz de sequestrar o radical •NO a coloração rosa diminui de intensidade, uma vez a quantidade de nitritos é menor e existe diminuição da reação dos mesmos com o reagente de Griess. A reação dos nitritos com o reagente de Griess está representada na Figura 21.

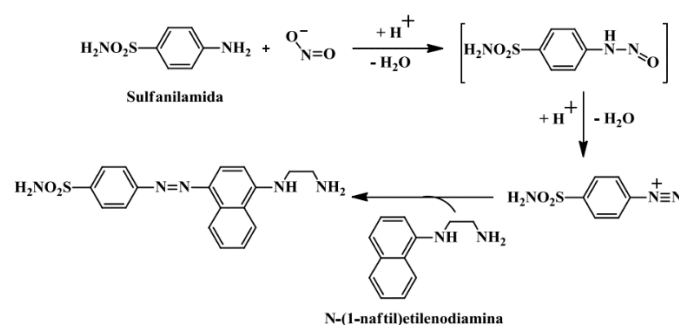


Figura 21. Reação de Griess (Filipe & Gonçalves, 2012).

Para a realização desta metodologia, foi necessário a preparação de uma solução tampão fosfato KH₂PO₄/K₂HPO₄ a 0,1 M e pH=7,4.

Seguidamente foi preparada a solução de SNP, a uma concentração de 20 mM, e por fim, foi preparado o reagente de Griess no qual foram pesados 1 g de sulfanilamida e 0,1 g de dicloridrato N-(1-naftil)etilenodiamina, dissolvidos em 100 mL de H₃PO₄ a 2 %.

Em relação às amostras, o extrato de *U. pinnatifida* foi dissolvido na solução tampão fosfato de modo a ser obtida uma solução stock com uma concentração de 6 mg/mL. A partir dessa solução stock, foram preparadas diluições em série com concentrações de 3,0; 1,5; 0,75; 0,39; 0,19 e 0,094 mg/mL, de acordo com o esquema da Figura 22.

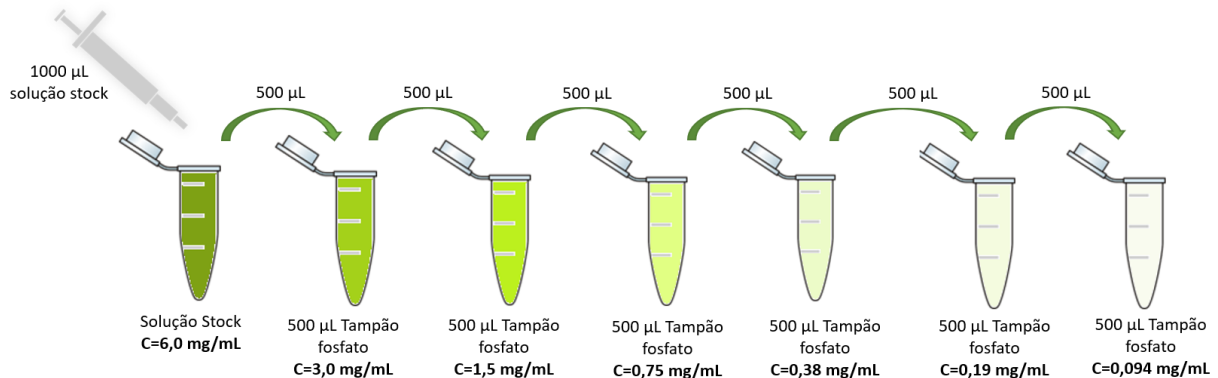


Figura 22. Representação esquemática das diluições em série realizadas para os extratos de *U. pinnatifida* obtidos da extração com água: etanol (50:50, v/v), no qual a concentração da solução stock do extrato apresentava uma concentração de 6,0 mg/mL.

Após a preparação das diluições dos extratos, os mesmos foram colocados em quadruplicado e em 3 séries numa microplaca (100 µL), e seguidamente foram adicionados 100 µL de SNP. Após a adição do SNP, a placa foi colocada a incubar durante 1h, na presença de luz. No final da incubação, foram adicionados 100 µL do reagente de Griess, seguido de mais um período de incubação de 10 min. Tendo em conta o volume de amostra e o volume de cada poço da microplaca, as concentrações no volume reacional apresentaram valores de 2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12; 0,062 e 0,031 mg/mL. A leitura dos resultados foi realizada num leitor de microplacas a um comprimento de onda de 560 nm, à temperatura ambiente.

O esquema da microplaca usado está representado na Figura 23, no qual a última linha (H) corresponde ao controlo negativo (não apresenta amostra), apresentando a solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a substituir os 100 µL de amostra e contendo os restantes reagentes do bioensaio. As colunas 4, 8 e 12 correspondem aos brancos, nos quais foram adicionados 100 µL de H_3PO_4 a 2 %, a substituir os 100 µL do reagente de Griess, e contendo também neste caso os restantes reagentes do bioensaio (100 µL amostra e 100 µL de SNP). Os restantes poços apresentam todos os reagentes necessários para a realização do método (100 µL amostra, 100 µL de SNP, 100 µL de reagente de Griess).

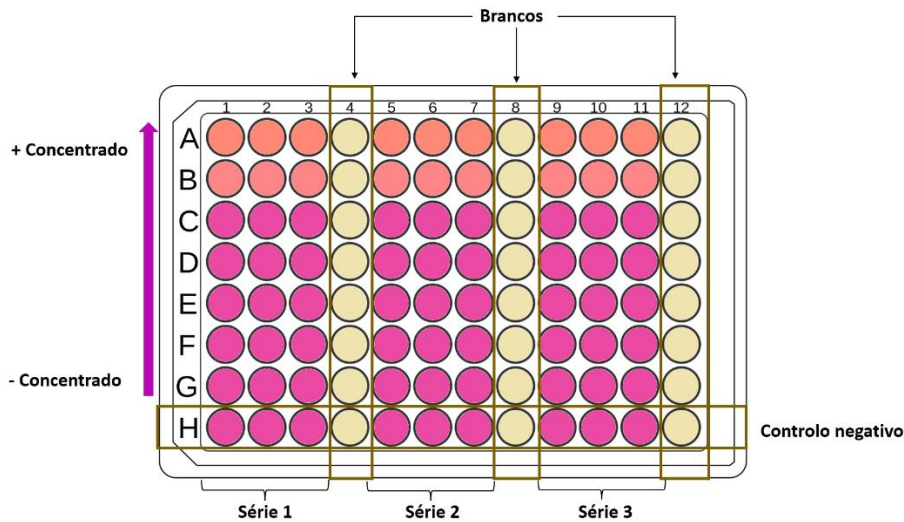


Figura 23. Representação esquemática da microplaca usada para o ensaio de sequestro do radical NO . Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra), Linhas A-G: Amostra mais concentrada à menos concentrada (2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12; 0,062 e 0,031 mg/mL). As colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco e não contêm o reagente de Griess.

O sequestro do NO foi calculado em termos de IC_{50} , através da equação 6 que envolve as absorvâncias (Abs) do controlo, dos brancos e das amostras.

3.3.6. Avaliação do sequestro do radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$)

A metodologia utilizada para a avaliação do sequestro do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, envolve o sistema NADH e metossulfato de fenazina (NADH/PMS), na medida em que o PMS é reduzido pelo NADH e seguidamente reage com o oxigénio, resultando dessa reação o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$. O radical formado reage posteriormente com o azul de nitrotetrazólio (NBT) reduzindo-o a formazano, um cromóforo que apresenta uma coloração azul e pode ser quantificado a 560 nm. Estas reações estão representadas na Figura 24. Caso exista uma molécula capaz de sequestrar o radical $\text{O}_2^{\cdot-}$, a velocidade de redução do NBT vai ser menor e assim sendo a coloração azul diminui de intensidade.

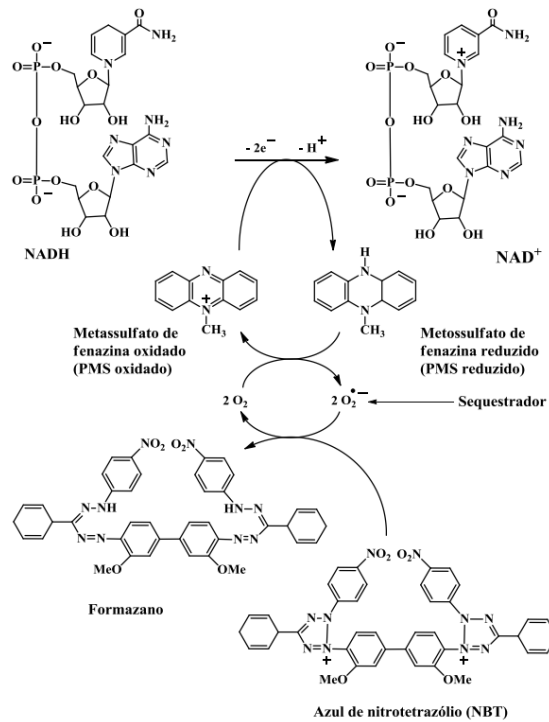


Figura 24. Reação de redução do PMS pelo NADH, e formação do formazano quantificável a 560 nm (Filipe & Gonçalves, 2012).

Para a realização desta metodologia, preparou-se uma solução tampão de KH₂PO₄/K₂HPO₄ a 19 mM, com um pH=7,4.

De seguida foram preparadas as soluções de NADH a 166 µM, NBT a 43 µM, e PMS a 2,7 µM, dissolvidas na solução tampão preparada previamente.

Em relação às amostras, foi preparada uma solução stock do extrato de *U. pinnatifida*, com uma concentração de 12 mg/mL, dissolvida em solução tampão. Em seguida foram preparadas diluições em série com concentrações de 6,0; 3,0; 1,50; 0,75; 0,38 e 0,19 mg/mL, de acordo com a Figura 25.

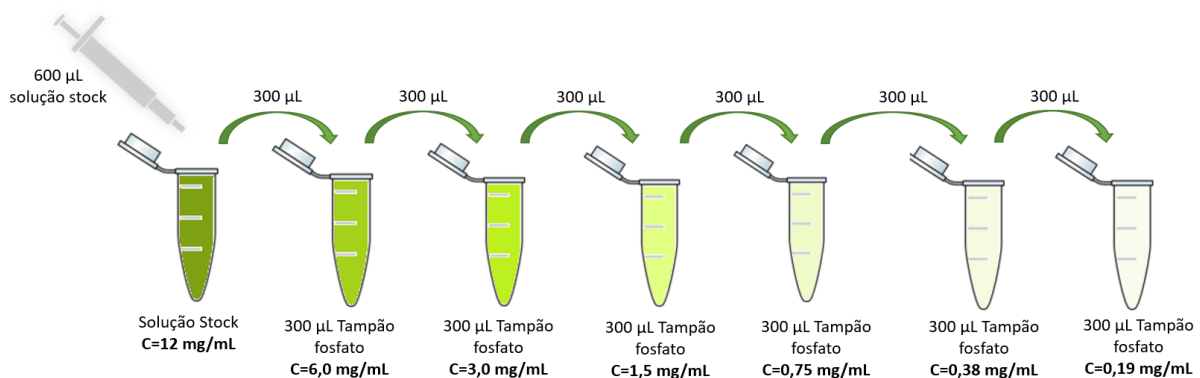


Figura 25. Representação esquemática das diluições em série realizadas para os extratos de *U. pinnatifida* obtidos da extração com água: etanol (50:50, v/v), no qual a concentração da solução stock do extrato apresentava uma concentração de 12 mg/mL.

Após a preparação das diluições dos extratos, os mesmos foram colocados em quadruplicado e em 3 séries numa microplaca (50 µL), e seguidamente foram adicionados 50 µL de NADH, 150 µL de NBT e 50 µL de PMS. Tendo em conta o volume de amostra e o volume de cada poço da microplaca,

as concentrações do extrato no poço apresentaram valores de 2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12; 0,062 e 0,031 mg/mL. A leitura dos resultados foi realizada num leitor de microplacas a um comprimento de onda de 560 nm à temperatura ambiente.

O esquema da microplaca usado está representado na Figura 26, no qual a última linha (H) corresponde ao controlo negativo que contém a solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a substituir os 50 μL de amostra e apresenta os restantes reagentes do bioensaio. As colunas 4, 8 e 12 correspondem aos brancos no qual existe a solução tampão $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ a substituir os 50 μL de PMS, apresentando também neste caso os restantes reagentes do bioensaio (50 μL amostra, 50 μL de NADH e 150 μL de NBT). Aos restantes poços adicionam-se todos os reagentes necessários para a realização do método (50 μL amostra, 50 μL de NADH, 150 μL de reagente de NBT e 50 μL de PMS).

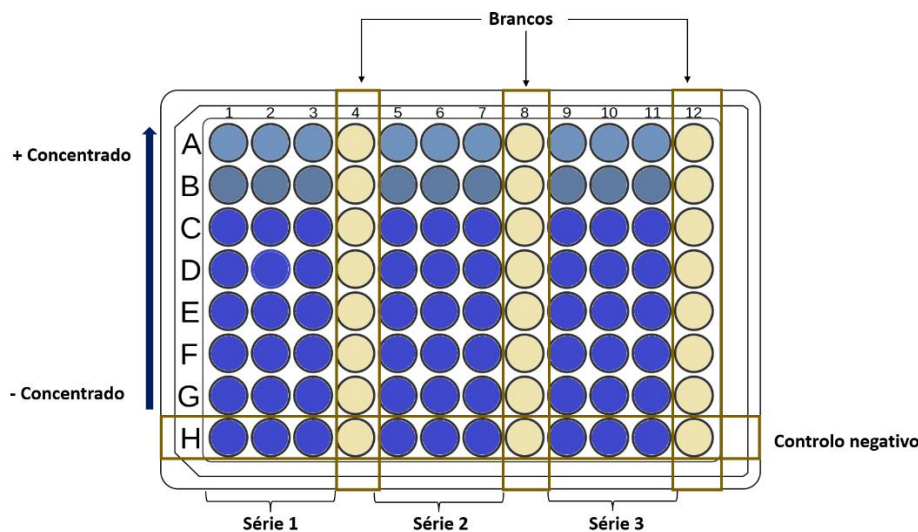


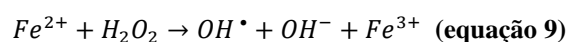
Figura 26. Representação esquemática da microplaca usada para o ensaio de sequestro do radical $\text{O}_2^{\cdot-}$. Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra), Linhas A-G: Amostra mais concentrada à menos concentrada (2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12; 0,062 e 0,031 mg/mL). As colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco e não contêm o PMS.

O sequestro do $\text{O}_2^{\cdot-}$ foi calculado em termos de IC_{50} , através da equação 8 que envolve as os declives do controlo, dos brancos e das amostras.

$$\% \text{ sequestro } \text{O}_2^{\cdot-} = \frac{(\text{Declive}_{\text{controlo}} - \text{Declive}_{\text{branco do controlo}}) - (\text{Declive}_{\text{amostra}} - \text{Declive}_{\text{branco da amostra}})}{(\text{Declive}_{\text{controlo}} - \text{Declive}_{\text{branco do controlo}})} \times 100 \text{ (equação 8)}$$

3.3.7. Avaliação do sequestro do radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$)

A metodologia para a avaliação do sequestro do $\cdot\text{OH}$ foi realizada de acordo com Mingjiang Geng, 2012; Smirnov & Cumbes, 1989, e envolve essencialmente a reação de Fenton, no qual através da reação entre o Fe^{2+} e o peróxido de hidrogénio ocorre a produção do $\cdot\text{OH}$, tal como demonstrado na equação 9 (Panchompoo et al., 2012).



O $\cdot\text{OH}$ produzido pela reação de Fenton por si só não pode ser quantificado espectrofotometricamente, uma vez que não ocorre a formação de um cromóforo. No entanto, como referido na Figura 27, a adição de ácido salicílico ao complexo reacional permite a formação de produtos de reação como o ácido 2,3-dihidroxibenzoico e ácido 2,5-dihidroxibenzoico, com coloração vermelha-alaranjada detetável a 510 nm. A deteção dos cromóforos formados permite de uma forma indireta determinar a produção de $\cdot\text{OH}$. Com a ação de moléculas capazes de sequestrar o $\cdot\text{OH}$ formados na reação de Fenton, ocorre conseqüentemente uma diminuição da produção de ácido 2,3-dihidroxibenzoico e ácido 2,5-dihidroxibenzoico levando a uma diminuição da intensidade da cor formada (Panchompoo et al., 2012).

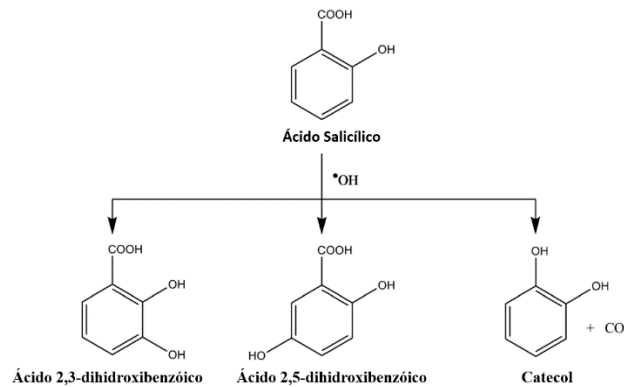


Figura 27. Reações de ligação do radical $\cdot\text{OH}$ ao ácido salicílico. Adaptado de (Panchompoo et al., 2012)

Para a realização do método, foi necessário preparar um conjunto de soluções como o ácido salicílico a 9mM, sulfato de ferro a 9mM e o peróxido de hidrogénio a 9mM.

O extrato de *U. pinnatifida* foi dissolvido em etanol de modo a ser obtida uma solução stock com uma concentração de 16 mg/mL a partir da qual foram preparadas diluições em série de acordo com o esquema da Figura 28.

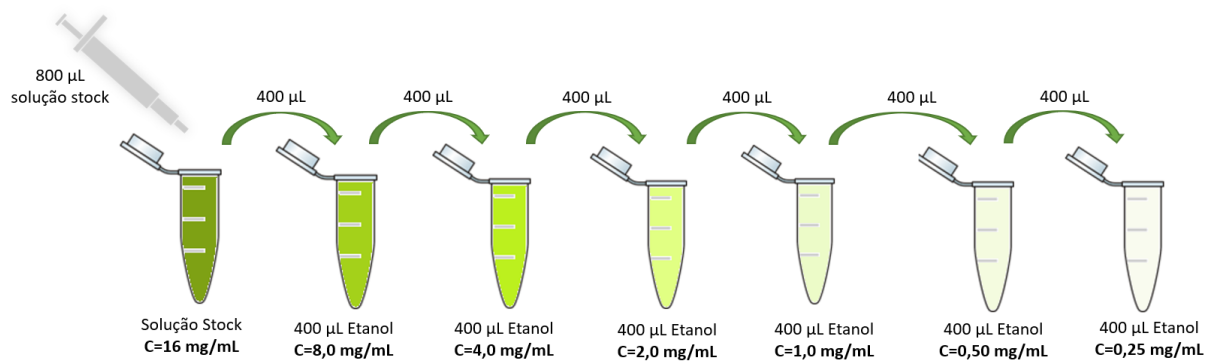


Figura 28. Representação esquemática das diluições em série realizadas para os extratos de *U. pinnatifida* obtidos da extração com água: etanol (50:50, v/v), no qual a concentração da solução stock do extrato apresentava uma concentração de 16 mg/mL.

Após a preparação das diluições dos extratos, os mesmos foram colocados em quadruplicado e em 3 séries numa microplaca (70 µL), e seguidamente foram adicionados 70 µL de ácido salicílico, 70 µL de sulfato de ferro e 70 µL de peróxido de hidrogénio. Tendo em conta o volume de amostra e o volume de cada poço da microplaca, as concentrações no volume reacional correspondem a 4,0; 2,0;

1,0; 0,50; 0,25; 0,12 e 0,062 mg/mL. A leitura dos resultados foi realizada num leitor de microplacas a um comprimento de onda de 510 nm e à temperatura ambiente.

O esquema da microplaca usado está representado na Figura 29, no qual a última linha (H) corresponde ao controlo negativo no qual foi adicionado água ultrapura a substituir os 70 µL de amostra e mantendo os restantes reagentes do bioensaio. As colunas 4, 8 e 12 correspondem aos brancos no qual existe água ultrapura a substituir os 70 µL de peróxido de hidrogénio, apresentando também neste caso os restantes reagentes do bioensaio (70 µL amostra, 70 µL de ácido salicílico e 70 µL de sulfato de ferro). Os restantes poços contêm todos os reagentes necessários para a realização do método (70 µL amostra, 70 µL de ácido salicílico, 70 µL de reagente de sulfato de ferro e 70 µL de peróxido de hidrogénio).

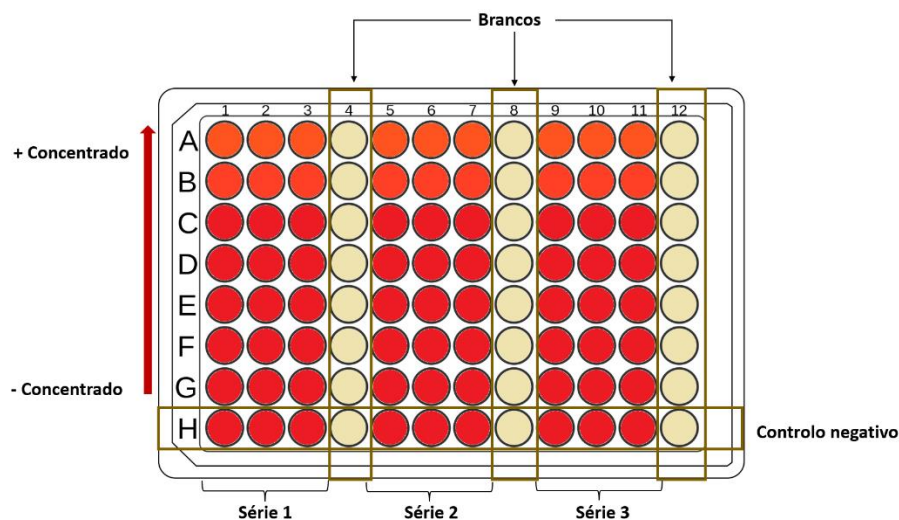


Figura 29. Representação esquemática da microplaca usada para o ensaio de sequestro do radical $\cdot\text{OH}$. Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra), Linhas A-G: Amostra mais concentrada à menos concentrada (4,0; 2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12 e 0,062 mg/mL). As colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco e não contêm o peróxido de hidrogénio.

O sequestro do $\cdot\text{OH}$ foi calculado em termos de IC_{50} , através da equação 6 que envolve as absorvâncias (Abs) do controlo, dos brancos e das amostras.

3.4. Ensaio *in vitro*: Avaliação da atividade enzimática

3.4.1. Quantificação da atividade inibitória das enzimas AChE e BuChE

A atividade inibitória das enzimas AChE e BuChE foi determinada de acordo com Ellman et al., 1961; Ingkaninan et al., 2000, 2003, Este método é conhecido como o método de Ellman e baseia-se na taxa de hidrólise do ATCI pela AChE que dá origem à tiocolina, que por sua vez vai reagir com o anião carboxilato do ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzóico) (DNTB), formando 2-nitrobenzoato-5-mercaptotiocolina e um anião 5'-ditiobis-2-nitrobenzoato (TNB^-). Este anião ioniza em meio aquoso a pH neutro ou básico, originando o TNB^{2-} que apresenta coloração amarela e pode ser quantificado através da espectrofotometria a 405-412 nm. Esta reação está representada na Figura 30. A reação de inibição da enzima BuChE, Figura 31, ocorre num mecanismo semelhante ao que ocorre na inibição da AChE, no entanto o substrato é o BTCi e a enzima é a BuChE. A formação da coloração amarela é diretamente dependente da concentração de tiocolina que é resultante da hidrólise do ATCI pela AChE, ou do BTCi pela BuChE, pelo que, a presença de inibidores destas enzimas limita a concentração de

tiocolina e, conseqüentemente, a intensidade absorvida é menor do que seria caso não existissem inibidores (Araújo et al., 2016; Mota et al., 2012).

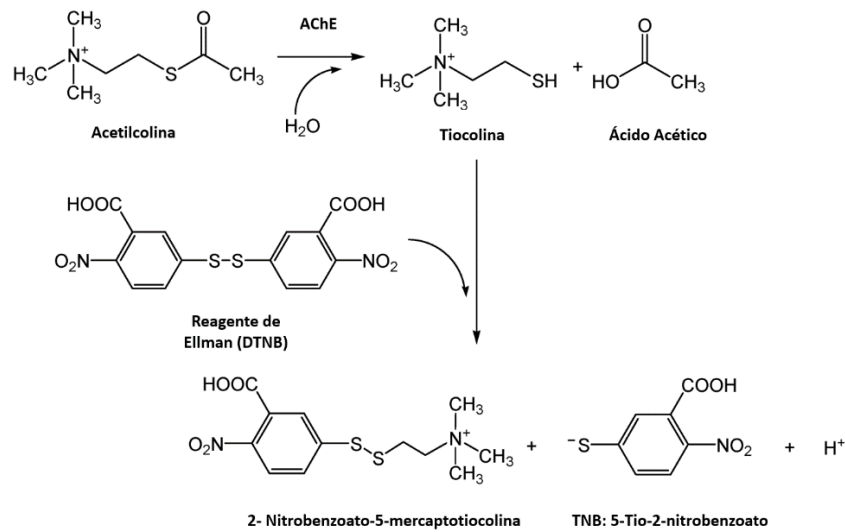


Figura 30. Reação de Ellman para a determinação da inibição da enzima AChE. Adaptado de (Matějovský & Pitschmann, 2018)

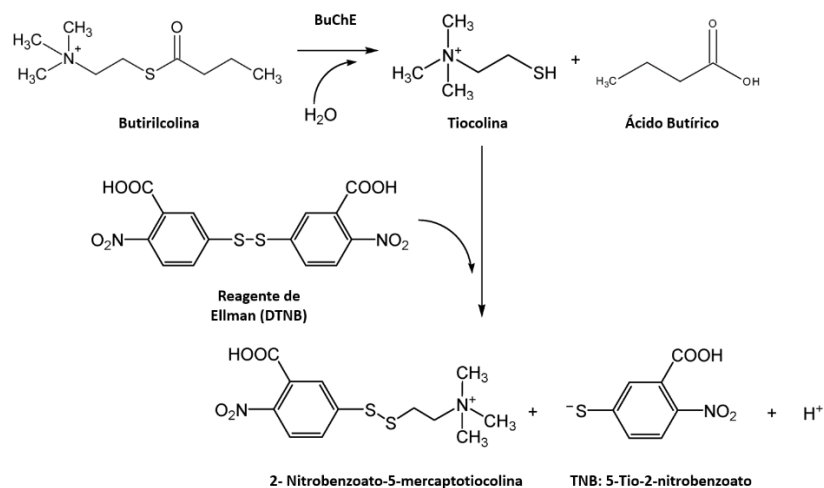


Figura 31. Reação de Ellman para a determinação da inibição da enzima BuChE. Adaptado de (Zeman et al., 2017)

Para a determinação da inibição das enzimas AChE e BuChE, foi necessário a preparação de um conjunto de soluções tampão, tais como:

- **Tampão A:** 50 mM de Tris-HCl com um pH=8;
- **Tampão B:** 50 mM de Tris-HCl, contendo 0,1 % de albumina de soro bovino (BSA), com um pH=8;
- **Tampão C:** 50 mM de Tris-HCl, contendo 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl₂ • 6H₂O.

Para além disso, foi também necessário a preparação das soluções de enzimas AChE e BuChE e dos respetivos substratos, iodeto de acetiltiocolina (ATCI) e iodeto de butiriltiocolina (BTCl). A AChE foi dissolvida em solução tampão A de modo a ser obtida uma solução stock com uma concentração de enzima de 500 U/mL, e posteriormente foi diluída em solução tampão B de modo a ser obtida uma concentração de AChE de 0,44 U/mL. Por outro lado, a BuChE foi preparada através da diluição da mesma em solução tampão A de modo a ser obtida uma solução stock com uma concentração de enzima

de 1000 U/mL, e posteriormente foi diluída em solução tampão B até uma concentração de BuChE de 0,4 U/mL. Em relação aos substratos, tanto a ATCI como a BTCl foram pesados e dissolvidos em água ultrapura de modo a apresentarem uma concentração de 15 mM.

Por fim, como fator importante na quantificação da atividade inibitória das enzimas AChE e BuChE, foi necessário a preparação do reagente de Ellman (DTNB) a uma concentração de 3 mM em solução tampão C.

Em relação às amostras, o extrato foi dissolvido em solução tampão A com 10 % de metanol para se produzir uma solução stock com uma concentração de 20 mg/mL. A partir da solução stock foram preparadas 6 diluições em série de 400 μ L, de acordo com a Figura 32.

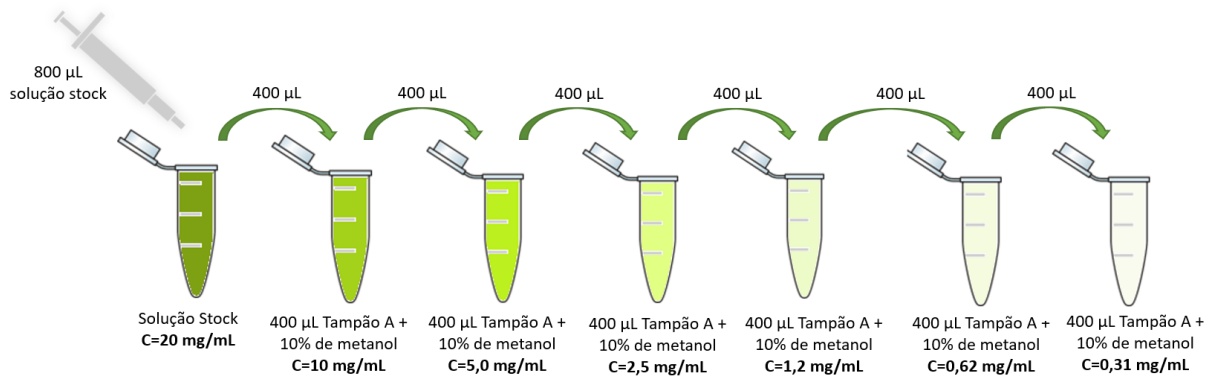


Figura 32. Representação esquemática das diluições em série realizadas para o extrato de *U. pinnatifida*, no qual a concentração da solução stock do extrato apresentava uma concentração de 20 mg/mL.

Após a preparação das diluições dos extratos, os mesmos foram colocados em quadruplicado e em 3 séries numa microplaca (25 μ L), seguida de 125 μ L DTNB, 50 μ L do tampão B, 25 μ L de ATCI ou BTCl e por fim 25 μ L de AChE ou BuChE. No final, de acordo com as diluições utilizadas, a concentração no volume reacional da microplaca apresentou valores como 2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12; 0,062 e 0,031 mg/mL. Posteriormente, para além destas concentrações por poço, foi testada também a concentração de 4,0 mg/mL, de modo a comprovar a atividade inibitória das enzimas numa concentração mais elevada.

O esquema da microplaca usado está representado na Figura 33, no qual a última linha (H) corresponde ao controlo negativo contendo tampão A com 10 % de metanol a substituir os 25 μ L de amostra e apresentando os restantes reagentes do bioensaio, e as colunas 4, 8 e 12 correspondem aos brancos no qual existe o tampão a substituir os 25 μ L de enzima e se adicionam os restantes reagentes do bioensaio (25 μ L amostra, 125 μ L de DTNB, 50 μ L de tampão B, 25 μ L de ATCI ou BTCl). Aos restantes poços foram adicionados todos os reagentes necessários para a realização do método (25 μ L amostra, 125 μ L de DTNB, 50 μ L de tampão B, 25 μ L de ATCI ou BTCl, e 25 μ L de AChE ou BuChE).

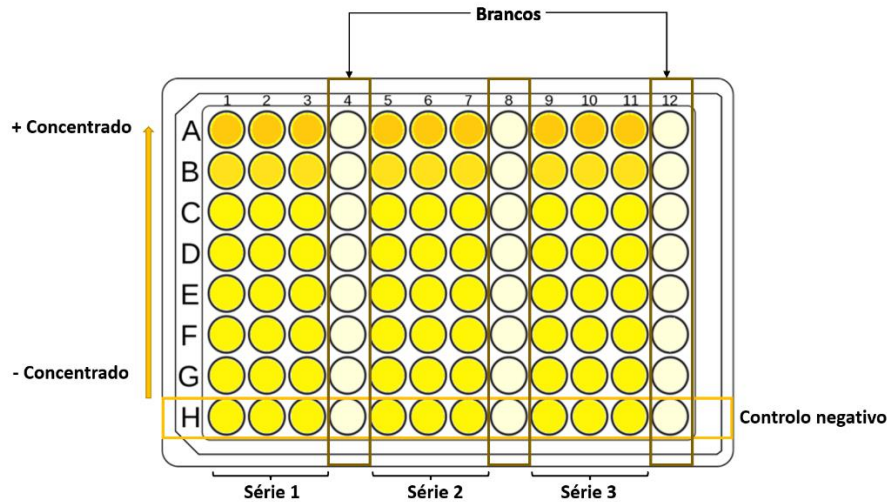


Figura 33. Representação esquemática da microplaca usada para o bioensaio de inibição da AChE e BuChE. Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra), Linhas A-G: Amostra mais concentrada à menos concentrada (2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12; 0,062 e 0,031 mg/mL). As colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco e não contêm enzima.

No final do preenchimento dos poços com a enzima (AChE ou BuChE) a leitura dos resultados foi realizada num leitor de microplacas a um comprimento de onda de 405 nm à temperatura ambiente. O software Gen5 2.0. permitiu a obtenção dos valores dos declives, e os valores de IC_{50} foram calculados de acordo com a equação (equação 8).

3.4.2. Quantificação da atividade inibitória da enzima Tirosinase

A atividade inibitória da tirosinase foi determinada de acordo com Masuda et al., 2005, 2007, 2008, no qual foi usada a reação da enzima tirosinase de cogumelo com a L-DOPA como substrato, juntamente com os extratos de *U. pinnatifida*. O dopacromo formado durante a reação de oxidação da L-DOPA pela tirosinase (Figura 2) é detetável a 475 nm, o que permite a determinação da atividade inibitória desta enzima.

Para a realização deste método foi necessário a preparação de uma solução tampão fosfato 1/15 M com um pH de 6,8.

Seguidamente foi necessário a preparação do substrato (2,5 mM) e da enzima (60 U/mL).

Por fim, foi também necessário preparar os extratos a testar, obtendo-se uma solução stock com uma concentração de 10 mg/mL a partir da qual foram realizadas diluições em série de acordo com o esquema da Figura 34.

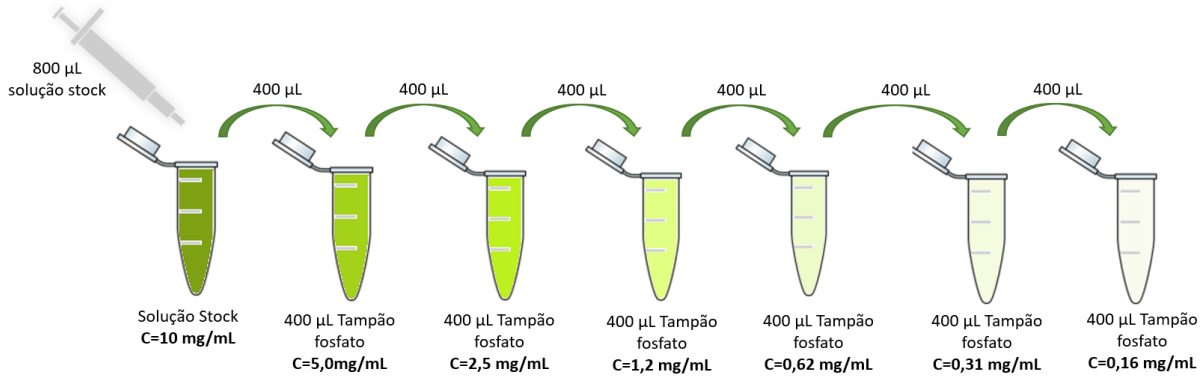


Figura 34. Representação esquemática das diluições em série realizadas para o extrato de *U. pinnatifida*, no qual a solução stock de extrato concentrado apresentava uma concentração de 10 mg/mL.

No final, de acordo com as diluições utilizadas, a concentração testada em cada poço da microplaca apresentou valores como 4,0; 2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12 e 0,062 mg/mL. Após a preparação de todas as diluições do extrato, procedeu-se à colocação dos mesmos em microplacas de 96 poços, de acordo com a Figura 35. Em cada poço foram adicionados em quadruplicado 40 µL de cada diluição ou solução tampão no caso do controlo negativo (Linha H), seguidos de 80 µL de solução tampão e 40 µL da enzima tirosinase, e colocou-se a microplaca a incubar à temperatura ambiente durante 10 minutos. No final desse intervalo de tempo adicionaram-se 40 µL de L-DOPA ou solução tampão no caso dos brancos das amostras (colunas 4, 8 e 12), e colocou-se novamente a incubar durante 10 minutos à temperatura ambiente.

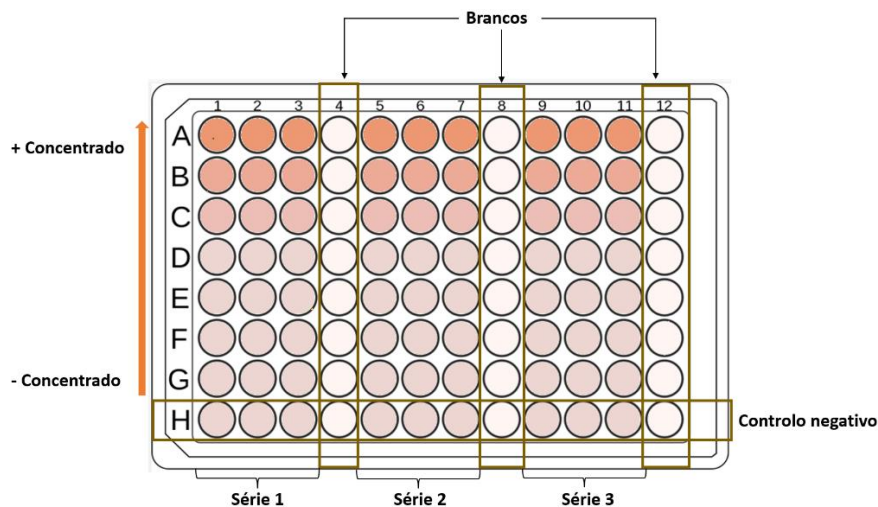


Figura 35. Representação esquemática da microplaca usada para o bioensaio de inibição da tirosinase. Legenda: Linha H: controlo negativo (não contém amostra), Linhas A-G: Amostra mais concentrada à menos concentrada (4,0; 2,0; 1,0; 0,50; 0,25; 0,12 e 0,062). Colunas 4, 8 e 12 correspondem ao branco e não contém L-DOPA.

Após o último tempo de incubação, foi feita a leitura dos resultados num leitor de microplacas a um comprimento de onda de 475 nm. O software Gen5 2.0. permitiu a obtenção dos valores de absorvância (Abs) do controlo, dos brancos e das amostras. A % de inibição foi calculada de acordo com a equação 6.

3.5. Ensaios *in vivo* dos extratos obtidos em embriões e larvas de peixe-zebra (*Danio rerio*)

Os ensaios *in vivo* tiveram como objetivo principal a avaliação da toxicidade do extrato de *U. pinnatifida* através da avaliação do desenvolvimento de embriões e larvas de peixe-zebra. A avaliação do desenvolvimento dos embriões e larvas de peixe-zebra foi realizada através da utilização de microscopia ótica invertida para a deteção do possível surgimento de anomalias em função da concentração de extrato de *U. pinnatifida* utilizada.

3.5.1. Avaliação do desenvolvimento embrionário do peixe-zebra (*Danio rerio*) pela ação do extrato de *U. pinnatifida*

Os organismos peixe-zebra utilizados para a realização deste trabalho nasceram e foram criados nas instalações certificadas para organismos aquáticos, no CIIMAR, Porto, Portugal. Os organismos reprodutores foram mantidos em crescimento em tanques de 70 L com circulação contínua de ar e água, com uma temperatura ambiente de 27 ± 1 °C. Para além disso, estavam sujeitos a um fotoperíodo de 14h na presença de luz e 10h na escuridão, de modo a simular as condições de habitat natural, e foram alimentados com Zebrafeed® um alimento apropriado para os peixes zebra, e artémia, um crustáceo marinho.

Para a reprodução, os machos e as fêmeas foram colocados numa maternidade numa razão de fêmeas: machos de 1:2. Para a aclimatização, a maternidade foi colocada no interior de um tanque de 30 L durante 12h e a mesma continha um fundo com uma rede coberta por esferas de vidro de forma a simular as condições naturais.

No final do período de reprodução e desova, no início do período de luz, as fêmeas e os machos foram retirados da maternidade e colocados novamente no tanque de 70 L juntamente com os restantes peixes-zebra. A maternidade foi retirada do interior do tanque de 30 L e os embriões que trespassaram a rede da maternidade foram retirados do fundo do tanque de 30 L e utilizados para os ensaios, que foram realizados de acordo com as orientações da OECD/OCDE, 1998.

Os embriões utilizados nos ensaios foram recolhidos, limpos e contados no período de 0-1h após fertilização, hpf. Os ensaios de análise do desenvolvimento dos peixe-zebra foram realizados em placas de 24 poços. Em cada poço foram colocados 5 embriões num volume final de meio de cultura de 2 mL. O meio que continha os embriões foi composto por diferentes concentrações do extrato de *U. pinnatifida* (água: etanol, 50:50, v/v) diluído numa solução tampão de tris-HCl com 10 % de metanol (0,1; 1,0; 10; 100; 1×10^3 ; 10×10^3 ; 50×10^3 e 100×10^3 µg/L). Os embriões foram expostos às diferentes concentrações de extrato durante um período de 96 hpf. As diferentes diluições do extrato de *U. pinnatifida* foram preparadas através de diluições em série com água a partir de uma solução stock com uma concentração de extrato de 20 mg/mL. Os ensaios, para além de apresentarem os embriões expostos às diferentes concentrações de extrato, foram também compostos por 2 controlos, um no qual os embriões foram expostos à água (controlo da água), e o outro ao solvente utilizado na diluição do extrato (tris-HCl com 10 % de metanol) (controlo solvente).

As placas utilizadas nos ensaios foram preenchidas no dia anterior ao início do ensaio, com o volume de tratamento (2 mL) de modo a evitar a adsorção durante o ensaio, e o meio de cultura foi renovado diariamente de forma a evitar o crescimento de microrganismos microscópicos que

interferissem com o ensaio e afetassem consequentemente os embriões. Os ensaios foram realizados em triplicado, e para cada concentração foram realizadas 6 réplicas, num total de 180 poços (7,5 placas).

As observações do desenvolvimento dos embriões de peixe-zebra foram realizadas em períodos de tempo específicos, de acordo com (Kimmel et al., 1995), de modo a ser avaliada a progressão normal do desenvolvimento embrionário (24, 48, 72 e 96 hpf). A mortalidade foi a observação comum a todos os períodos de exposição ao extrato de *U. pinnatifida* e as restantes observações do desenvolvimento específicas a cada período de exposição estão representadas na Tabela 6.

Tabela 6. Observações do desenvolvimento embrionário do peixe-zebra realizadas para os diferentes períodos de exposição (24, 48, 72 e 96 hpf).

Anomalias/ deformações observadas	Período de exposição (hpf)			
	24	48	72	96
Mortalidade	✓	✓	✓	✓
Somitos	✓			
Deformação do saco vitelino	✓	✓	✓	✓
Anomalias no destacamento da cauda	✓	✓		
Eclosão		✓		
Malformação dos olhos		✓	✓	✓
Anomalias na pigmentação		✓	✓	✓
Anomalias na circulação sanguínea		✓	✓	✓
Deformação esquelética			✓	✓
Posição lateral da larva				✓

No final do período de exposição e observação às 96 hpf, as larvas foram fotografadas para posterior medição dos respetivos tamanhos e por fim recolhidas dos meios de cultura e armazenadas em microtubos eppendorf a -80 °C, para análises futuras.

A medição dos tamanhos das larvas foi realizada através do programa ImageJ, como demonstrado na Figura 36. O tamanho das mesmas foi calculado pela comparação de uma linha de referência com um tamanho conhecido de 10 mm (A), com uma linha criada no programa a delimitar o comprimento da larva da cauda à cabeça (B). O tamanho das larvas de peixe-zebra é calculado pelo programa e os valores são apresentados numa tabela em mm.

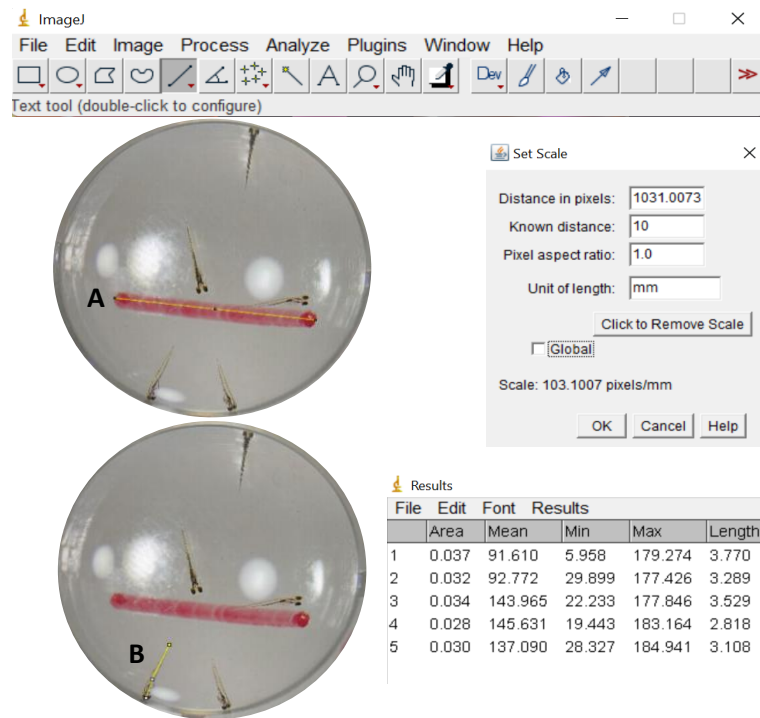


Figura 36. Metodologia de determinação do tamanho das larvas de peixe-zebra, pela utilização do programa ImageJ.

3.6. Análise Estatística dos Resultados

Os resultados obtidos nas análises *in vitro* foram recolhidos e guardados num ficheiro Excel e posteriormente tratados através do software GraphPad Prism 8, que apresenta biblioteca de análises desde testes ANOVA de um, dois e três fatores e curvas de dose-resposta de importante utilização neste trabalho. A análise ANOVA foi realizada para um fator e com comparações múltiplas entre as médias.

Os resultados obtidos nas análises *in vivo* relativamente à ocorrência de malformações nos embriões ou larvas do peixe-zebra expostos ao extrato foram analisadas a partir do teste estatístico qui-quadrado, seguido de comparações múltiplas com correção de Bonferroni quando se encontraram diferenças significativas. Os possíveis efeitos do extrato no comprimento total das larvas de peixe-zebra eclodidas, foram analisados através do teste estatístico ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnet. Foram verificados os pressupostos de aplicação da ANOVA utilizando o teste de Shapiro-Wilk (normalidade dos dados) e o teste de Levene (homogeneidade de variâncias). Os testes estatísticos foram realizados com o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences – Pacote Estatístico para as Ciências Sociais) versão 27 e um nível de significância de 5 %.

Capítulo 4 – Resultados e Discussão

4.1. Extrações Convencionais

4.1.1. Rendimento das Extrações

No final das extrações e evaporação do solvente determinaram-se os valores das massas dos extratos de *U. pinnatifida* secos para cada extração realizada. A partir dessas massas e a partir das massas iniciais de alga utilizada, foi calculado o rendimento em percentagem para cada extração, de acordo com a equação 1. Na Figura 37 estão apresentados os rendimentos relação obtidos para as extrações realizadas durante 1h nas razões sólido: solvente 1:10 e 1:20 g/mL a 25 °C (A) e 40 °C (B), e para as extrações realizadas durante 2h nas razões 1:10 e 1:20 a 25 °C (C) e 40 °C (D).

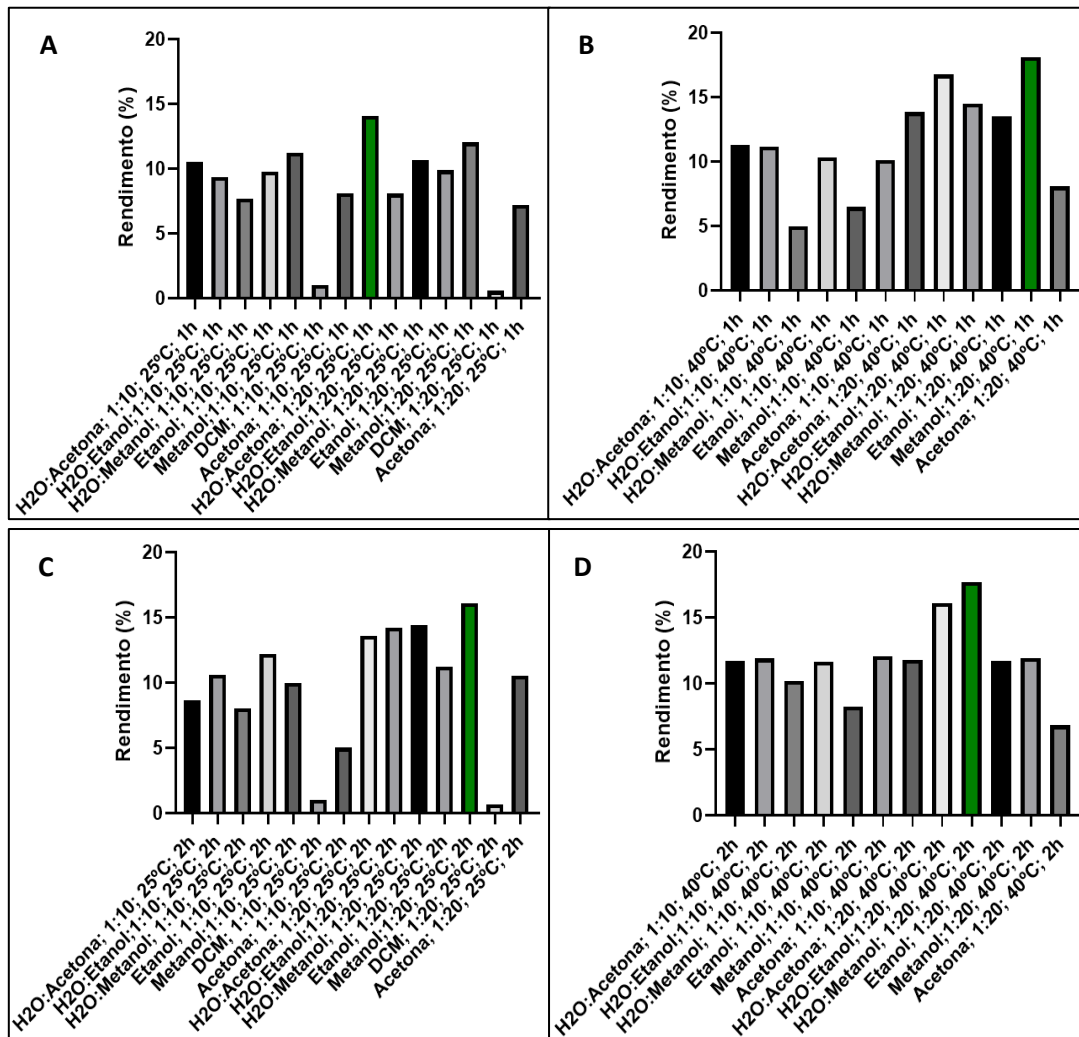


Figura 37. Rendimentos (%) obtidos para as extrações convencionais realizadas nas razões sólido: solvente de 1:10 e 1:20 g/mL a 25 °C (A) e 40°C (B) durante 1h e nas mesmas condições durante 2h (C e D), respetivamente.

Analisando individualmente cada representação gráfica, pode-se verificar que para as extrações de 1h a 25 °C (Figura 37 A), o melhor rendimento foi obtido para a extração utilizando a mistura de solventes água: acetona (10:90 v/v) na razão de 1:20 g:mL, apresentando um valor de 14,1 %. Na mesma figura, mas para as extrações de 1h a 40 °C (Figura 37 B), pode-se verificar que o rendimento mais elevado foi obtido para a extração com metanol na razão de 1:20 g:mL, apresentando um valor de 18,1%. Em relação às extrações de 2h a 25 °C (Figura 37 C), verifica-se que se obteve um melhor rendimento

na extração com metanol na razão de 1:20 g:mL, com um valor de 16,1 %. Por fim, para as extrações a 40 °C (Figura 37 D), verifica-se que o melhor rendimento foi obtido para a extração com água: metanol (50:50, v/v) na razão 1:20 g:mL, com um valor de 11,9 %. Perante estes resultados constatou-se que a extração que permitiu a obtenção de um melhor rendimento foi a extração de 1h com metanol na razão sólido: solvente de 1:20 g:mL a uma temperatura de 40 °C.

Na Figura 37, considerando as temperaturas de extração, também é possível verificar que na maioria dos casos, as temperaturas mais altas (40 °C) são as que permitem a obtenção de melhores rendimentos, resultado concordante quando se analisa a literatura, uma vez que segundo Lourenço-Lopes et al., 2022 para uma extração da *U. pinnatifida* (Harvey) Suringar proveniente do Algarve, com água: acetona (10:90 v/v), no rácio 1:30 g:mL, de 1h a 45 °C foi obtido um rendimento de 11,69 %, enquanto que para a mesma extração a 65 °C foi obtido um rendimento de 13,63 %.

Quando se compara o rendimento das extrações em termos das razões 1:10 e 1:20 g:mL, pode verificar-se que de uma forma geral as extrações realizadas com maior razão sólido: solvente (1:20 g:mL) apresentam maior rendimento. Lourenço-Lopes et al., 2022, reportaram que para uma extração com uma razão de 1:30 g:mL como solvente água: acetona (10:90 v/v) durante 30 min a 25 °C foi obtido um rendimento de 15,11 %, valor este superior aos 14,1 % obtidos neste trabalho para uma razão de 1:20 g:mL numa extração de 1h. Ou seja, mesmo com tempos de extração mais curtos, uma maior razão de sólido: solvente permite atingir maiores rendimentos de extração.

Por outro lado, era de esperar que os tempos de extração mais longos possibilitassem a obtenção de melhores rendimentos, no entanto quando se comparam os gráficos da Figura 37 A e B com os gráficos da Figura 37 C e D, é perceptível que o aumento do tempo de extração de 1h para 2h não influenciou o rendimento das extrações. É possível que tenha ocorrido a saturação dos solventes antes do final do período de extração de 2h. Estes resultados podem também ser comparados com a literatura. Lourenço-Lopes et al., 2022, realizou uma extração com água: acetona (10:90 v/v) a 25 °C durante 30 min apresentando um rendimento de 15,11 %, semelhante ao obtido para a mesma extração realizada durante 2h (14,64 %). Para além disso, extrações com o mesmo solvente a 45 °C, realizadas com as durações de 1h e 3,5 h apresentaram rendimentos de 11,69 % e 12,08 %, respetivamente, no qual se pode verificar um aumento de 2,5 h na extração apenas levou um aumento de 0,39 % ao valor do rendimento obtido para a extração de 1h (Lourenço-Lopes et al., 2022).

Para além da análise do rendimento, também a extração de compostos com bioatividade (antioxidantes e neuroprotetores) foi avaliada para todas as condições de descritas. Nas secções seguintes apresentam-se os resultados relativos ao conteúdo fenólico total e carotenoides e clorofilas que apresentam ação antioxidante.

4.1.2. Conteúdo fenólico total (TPC)

Na Figura 38 estão apresentados os resultados relativos ao TPC (mg GAE/g extrato) em relação a todas as extrações realizadas a 25 °C e razões de 1:10 e 1:20 g:mL, para os tempos de extração de 1h (Figura 38 A) e 2h (Figura 38 B), e para 40 °C e razões de 1:10 e 1:20 g:mL, para os tempos de extração de 1h (Figura 38 C) e 2h (Figura 38 D). Por fim, é apresentada também a comparação dos resultados em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extrações com duração de 1h nas razões de 1:10 (Figura 38 E) e 1:20 (Figura 38 F) g:mL.

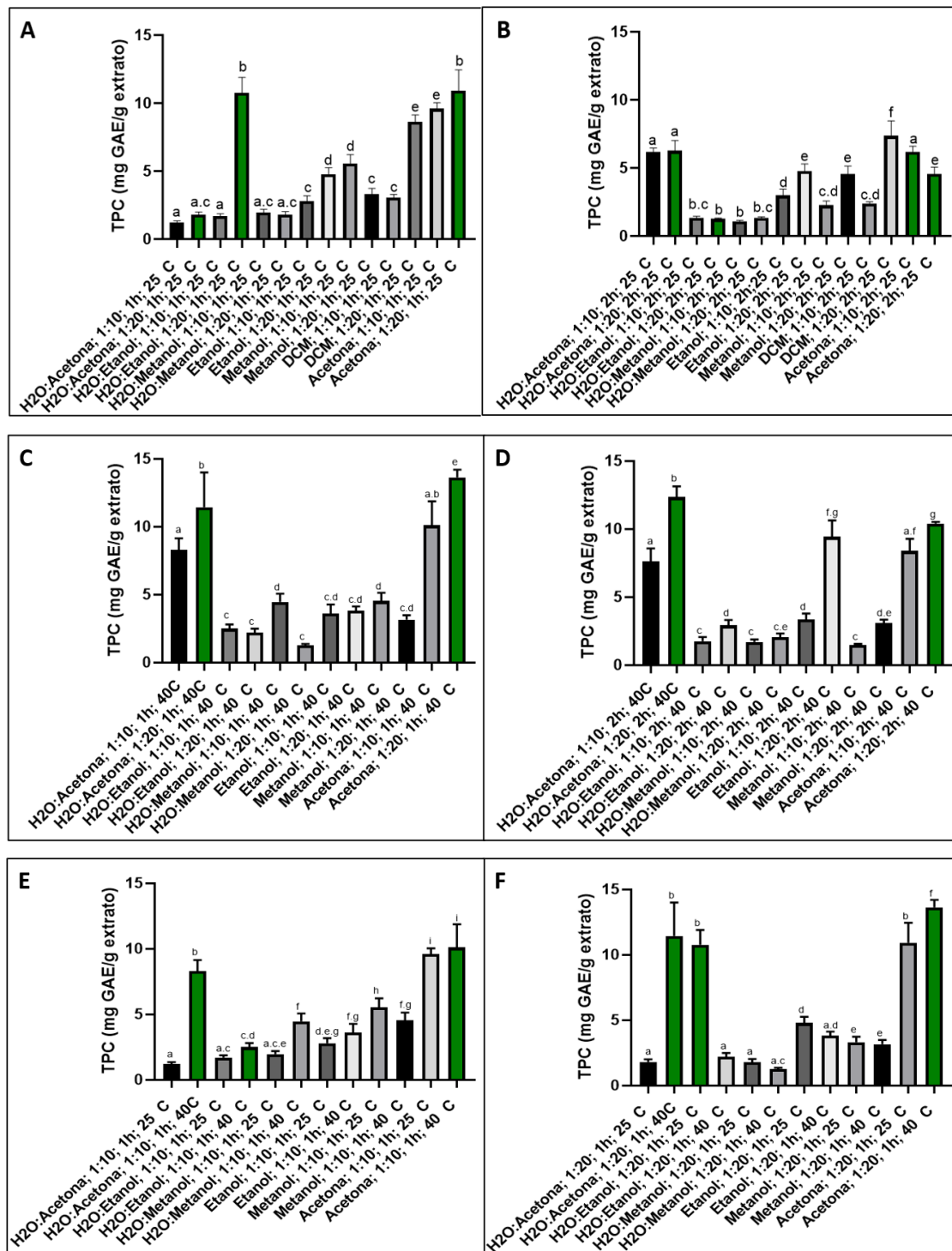


Figura 38. Comparação dos resultados TPC (mg/g de extrato seco) em relação às razões (1:10 e 1:20 g:mL) para as extrações convencionais com duração de 1h (A) e 2h (B) a 25 °C, e 1h (C) e 2h (D) a 40 °C, juntamente com a comparação dos resultados TPC (mg/g de extrato seco) em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extrações com duração de 1h nas razões de 1:10 (E) e 1:20 (F) g:mL.

Pela análise da Figura 38, para os tempos de extração de 1h (Figura 38 A) como para os de 2h (Figura 38 B), a 25°C, os solventes que permitiram a obtenção de valores mais altos de TPC foram a mistura de solventes água: etanol e água: acetona, e a acetona. Para esses solventes, a razão 1:20 g:mL possibilitou, de uma forma geral, a obtenção de melhores resultados na medida em que a mistura de solventes água: etanol (Figura 38 A) apresentou um valor de TPC, em mg GAE/ g de extrato seco, de

$10,76 \pm 1,13$, a mistura água: acetona (Figura 38 B) apresentou um valor de $6,25 \pm 0,30$, e a acetona (Figura 38 A), um valor de $10,92 \pm 1,52$.

Relativamente à temperatura de 40°C , tanto para os tempos de extração de 1h (Figura 38 C) como para os de 2h (Figura 38 D), os valores de TPC mais elevados foram conseguidos com a mistura de solventes água: acetona, e a acetona. Para esses solventes, a razão 1:20 g:mL possibilitou de uma forma geral a obtenção de melhores resultados na medida em que a mistura de solventes água: acetona (Figura 38 D) apresentou um valor de TPC, em mg GAE/ g de extrato seco, de $12,34 \pm 0,79$ e a acetona (Figura 38 C), um valor de $13,63 \pm 0,57$.

Relativamente à temperatura de extração, pode concluir-se que os solventes que resultam nos valores mais altos de TPC são a mistura de solventes água: acetona e água: etanol, e a acetona, nas condições de temperatura de 40°C e razões sólido: solvente de 1:20 g:mL, uma vez que a mistura de solventes água: acetona (Figura 38 F) apresentou um valor de TPC de $11,45 \pm 2,55$ mg GAE/ g de extrato seco e a acetona (Figura 38 B) apresentou um valor de $13,63 \pm 0,57$ mg GAE/ g de extrato seco. Por outro lado, a mistura água: etanol (Figura 38 F), contrariamente aos restantes solventes, apresentou um melhor resultado TPC para uma temperatura de extração de 25°C (Figura 38 E) com um valor de $10,76 \pm 1,13$ mg GAE/ g de extrato seco.

Através da análise das Figura 38 (A, B, C e D) pode-se verificar que em relação ao tempo de extração, tal como ocorreu em termos do cálculo do rendimento, o aumento do tempo de extração de 1 para 2h não afetou significativamente os resultados do conteúdo de TPC. Considerando que os solventes podiam encontrar-se saturados antes do final das 2h de extração, e que por isso o intervalo de tempo de 1-2h não influenciava os resultados, não foram comparados os resultados em termos de tempos de extração, ou seja, 1h vs 2h.

Xie et al., 2021, utilizaram a *U. pinnatifida* (Harvey) Suringar comprada na cidade de Dalian, província de Liaolína para uma extração a 25°C durante 2h, com a utilização de solventes semelhantes aos utilizados neste trabalho, tais como água: metanol (30:70 v/v), água: etanol (30:70 v/v) e água: acetona (30:70 v/v), e uma razão de 1:30 g:mL, obtendo valores de TPC de respetivamente, $1,93 \pm 0,13$, $4,84 \pm 0,19$ e $7,38 \pm 0,24$ mg GAE/ g de extrato seco.

No caso da água: metanol e água: etanol, os resultados do TPC, de acordo com Xie et al., 2021, são mais baixos comparando com os obtidos neste trabalho com os extratos de *U. pinnatifida* para as mesmas misturas de solventes, no entanto para proporções v/v diferentes, nomeadamente água: metanol (50:50 v/v), água: etanol (50:50 v/v) e para extrações realizadas a 25°C durante 1h e na razão 1:20 g:mL, em que os resultados TPC foram respetivamente, $5,55 \pm 1,52$ e $10,76 \pm 1,13$ mg GAE/ g de extrato seco. Por outro lado, no caso da água: acetona, os resultados do TPC destes autores, Xie et al., 2021, foram ligeiramente superiores em comparação com os obtidos no presente estudo ($6,25 \pm 0,30$ mg GAE/ g de extrato seco). No entanto, a análise destes resultados permite verificar que as misturas de solventes água: etanol e água: acetona, são as que permitem a obtenção de melhores resultados TPC.

As mesmas extrações realizadas com os solventes água: etanol em diferentes espécies de algas, tais como o *Sargassum palidum*, *Hizikia fusiforme* e *Ecklonia kurome*, permitiram verificar que os resultados do TPC foram respetivamente, $3,47 \pm 0,19$, $11,63 \pm 0,23$ e $5,51 \pm 0,16$ mg GAE/ g de extrato seco (Xie et al., 2021). A alga *Hizikia fusiforme* apresentou um resultado de TPC superior ao verificado na *U. pinnatifida* ($10,76 \pm 1,13$ mg GAE/ g de extrato seco - Figura 38 E). Já para as extrações realizadas com a água: acetona, nas mesmas espécies de algas *S. palidum*, *H. fusiforme* e *E. kurome*, os resultados TPC foram de $6,25 \pm 0,36$, $15,44 \pm 0,41$ e $6,91 \pm 0,32$ mg GAE/ g de extrato seco, respetivamente. No caso da alga *S. palidum*, esta apresentou valores semelhantes aos obtidos para a *U. pinnatifida* e as algas

H. fusiforme e *E. kurome* apresentaram valores de TPC superiores aos obtidos para a *U. pinnatifida* ($6,25 \pm 0,30$ mg GAE/ g de extrato seco) (Xie et al., 2021).

4.1.3. Conteúdo de carotenoides e clorofilas

O conteúdo de carotenoides e clorofilas foi obtido através dos valores das absorvâncias lidas nos diferentes comprimentos de onda 480, 632, 652, 665, 696 e 750 nm, e usando as equações 2, 3, 4 e 5.

4.1.3.1. Conteúdo de Clorofila *a*

Para a quantificação do teor de clorofila *a*, os valores das absorvâncias lidas em triplicado para os comprimentos de onda de 632, 652, 665, 696 e 750, foram usados na equação 2. Os valores de clorofila *a* em mg/g de extrato seco estão representados graficamente na Figura 39.

A Figura 39 apresenta os resultados relativos ao conteúdo de clorofila *a* em relação a todas as extrações realizadas a 25 °C e razões de 1:10 e 1:20 g:mL, para os tempos de extração de 1h (Figura 39 A) e 2h (Figura 39 B), e para 40 °C e razões sólido: solvente de 1:10 e 1:20 g:mL, para os tempos de extração de 1h (Figura 39 C) e 2h (Figura 39 D). Por fim, apresenta-se também a comparação dos resultados em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extrações com duração de 1h nas razões de 1:10 (Figura 39 E) e 1:20 g:mL (Figura 39 F). Tal como para os valores do rendimento e do TPC, o tempo de extração não influenciou os resultados obtidos para a clorofila *a* e por isso estes não foram comparados.

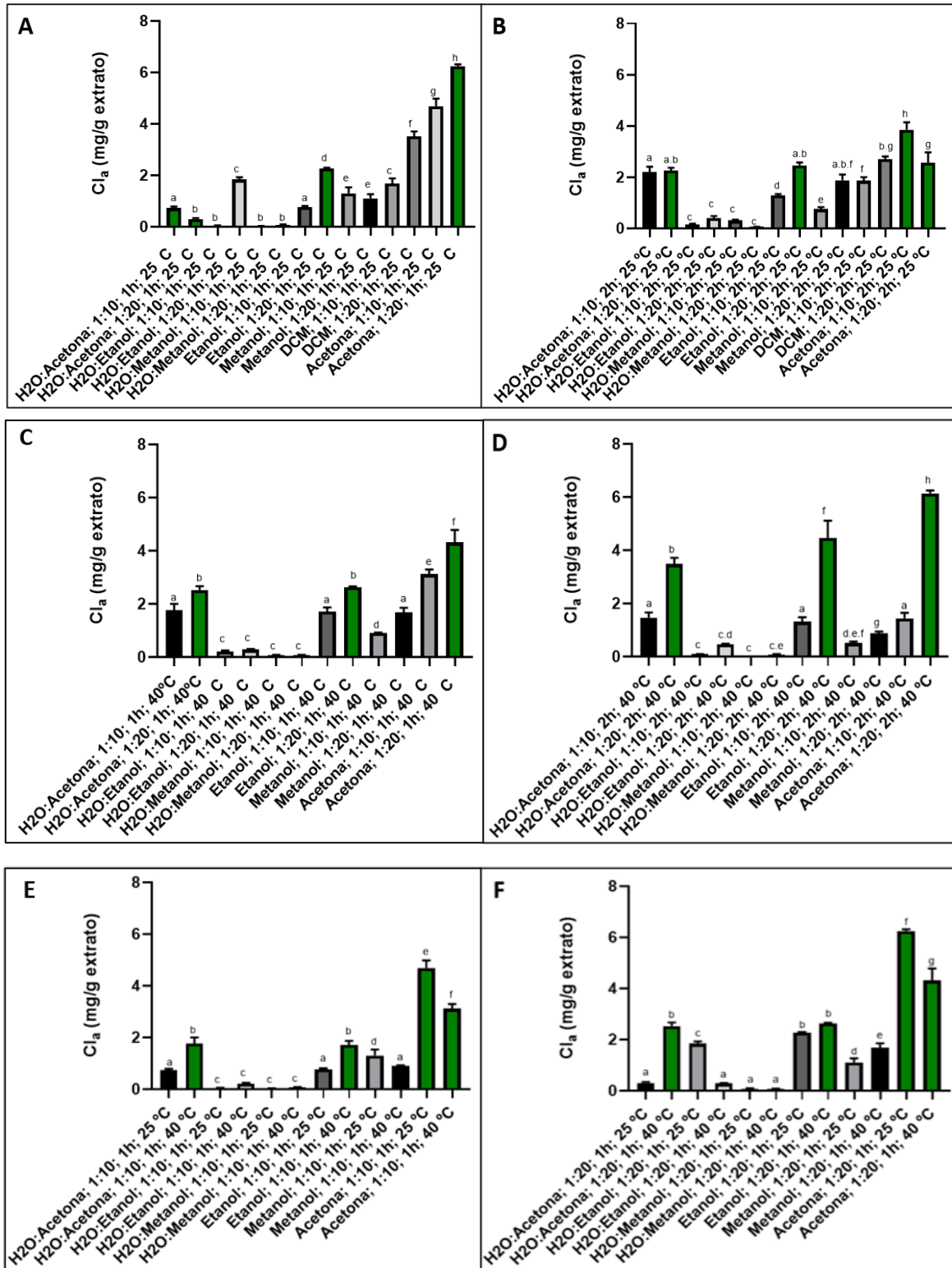


Figura 39. Comparação dos resultados do teor de clorofila a (mg/g de extrato seco), em relação às razões (1:10 e 1:20 g:mL) para as extrações convencionais com duração de 1h (A) e 2h (B) a 25 °C, e 1h (C) e 2h (D) a 40 °C, juntamente com a comparação dos resultados do conteúdo de clorofila a (mg/g de extrato seco) em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extrações com duração de 1h nas razões de 1:10 (E) e 1:20 (F) g:mL.

Pela análise da Figura 39, para os tempos de extração de 1h (Figura 39 A) e de 2h (Figura 39 B), a 25 °C, os solventes que permitiram a obtenção de valores mais elevados de clorofila a foram a mistura de solventes água: etanol e água: acetona, etanol e acetona. Para esses solventes, a razão sólido:

solvente de 1:20 g:mL possibilitou de uma forma geral a obtenção de melhores resultados, uma vez que com a mistura de solventes água: acetona (Figura 39 B) o teor de clorofila *a* foi de $2,26 \pm 0,11$ mg/g de extrato seco, com a mistura água: etanol (Figura 39 A) de $1,84 \pm 0,084$ mg/g de extrato seco, com o etanol de $2,46 \pm 0,11$ mg/g de extrato seco e com a acetona um conteúdo de $6,25 \pm 0,068$ mg/g de extrato seco.

Quando se comparam os resultados dos valores de clorofila *a* para os tempos de extração de 1h (Figura 39 C) e de 2h (Figura 39 D), a 40 °C, os solventes que permitiram os melhores resultados foram a mistura de solventes água: acetona, o etanol e a acetona. Sendo que também para este caso, as razões 1:20 g:mL favoreceram a obtenção de maior quantidade de clorofila *a*, na medida em que a utilização da mistura dos solventes água: acetona (Figura 39 D) resultou num valor de $3,47 \pm 0,24$ mg/g de extrato seco, com o etanol (Figura 39 D) de $4,46 \pm 0,65$ mg/g de extrato seco e com a acetona (Figura 39 D) $6,13 \pm 0,12$ mg/g de extrato seco.

Por fim, em termos da temperatura de extração, pode-se comprovar que os solventes que permitem a obtenção de melhores resultados de clorofila *a* são a mistura de solventes água: acetona, o etanol e a acetona, nas condições de temperatura de 40 °C e razão sólido: solvente de 1:20 g:mL, na medida em que a mistura de solventes água: acetona (Figura 39 F) apresentou um conteúdo de clorofila *a*, em mg/ g de extrato seco, de $1,77 \pm 0,24$, e a acetona (Figura 39 F) apresentou um valor de $1,71 \pm 0,16$. Por outro lado, a acetona, contrariamente aos restantes solventes, apresentou uma maior quantidade de clorofila *a* para uma temperatura de extração de 25 °C e para a razão de 1:10 g:mL (Figura 39 E) com um valor de $4,70 \pm 0,28$ mg/ g de extrato seco.

Segundo Garcia-Perez et al., 2022 , extrações da *U. pinnatifida* com solventes como o etanol e a acetona, nas razões sólido/solvente de 1:30 g:mL, a uma temperatura de 50 °C e numa duração de 24h, demonstram que a extração realizada com o etanol permite a obtenção de 0,0337 mg/g de extrato seco de clorofila *a*, e no caso da utilização da acetona, 0,773 mg/g de extrato seco de clorofila *a*. Pela comparação dos resultados obtidos com os resultados referidos na literatura, pode-se verificar que a utilização dos mesmos solventes nas extrações realizadas na *U. pinnatifida* durante este trabalho, permitiram a obtenção de valores de clorofila *a* mais elevados utilizando razões sólido: solvente, temperatura e duração de extração menores do que os mencionados na literatura. No entanto, tanto na literatura como neste trabalho, a utilização da acetona permitiu a obtenção de um maior conteúdo de clorofila *a* em comparação com a utilização do etanol como solvente de extração.

Também segundo Garcia-Perez et al., 2022, o teor de clorofila *a* na *U. pinnatifida*, extraído com os solventes etanol e acetona é menor quando comparado com o extraído com os mesmos solventes em algas como a *Himanthalia elongata* e *Laminaria ochroleuca*, na medida em que o solvente etanol permitiu a extração de 1,0396 mg/ g de extrato seco de clorofila *a* na *H. elongata*, e 0,4328 mg/ g de extrato seco na *L. ochroleuca*, e a acetona permitiu a extração de 1,3082 mg/ g de extrato seco de clorofila *a* na *H. elongata*, e 1,3939 mg/ g de extrato seco na *L. ochroleuca*.

4.1.3.2. Conteúdo de Clorofila *c*

Os resultados da quantificação de clorofila *c*, foram obtidos de forma semelhante ao adotado para a clorofila *a*, no entanto neste caso os valores das absorvâncias obtidas nos comprimentos de onda de 632, 652, 665, 696 e 750, foram usados na equação 3, e o conteúdo de clorofila *c* apresentados em mg/ g de extrato seco. O teor de clorofila *c* obtido a partir da utilização das diferentes condições de extração estão representados na Figura 39.

A Figura 39 apresenta os resultados relativos aos valores de clorofila *c* em relação a todas as extrações realizadas a 25 °C e razões de 1:10 e 1:20 g:mL, para os tempos de extração de 1h (Figura 39 A) e 2h (Figura 39 B), e para 40 °C e razões de 1:10 e 1:20 g:mL, para os tempos de extração de 1h (Figura 39 C) e 2h (Figura 39 D)., apresenta É apresentada também a comparação dos resultados em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extrações com duração de 1h nas razões de 1:10 (Figura 39 E) e 1:20 g:mL (Figura 39 F).

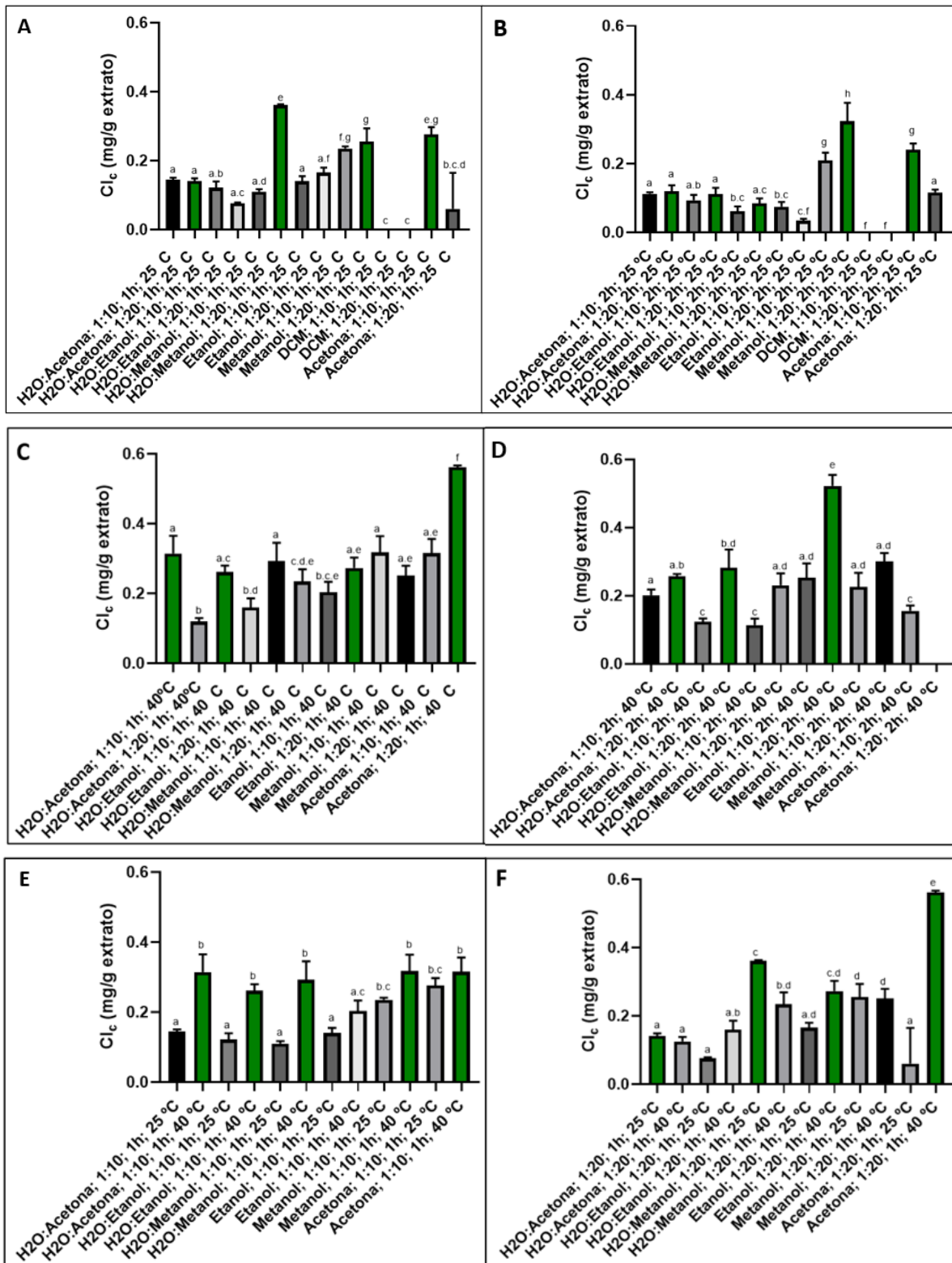


Figura 40. Comparação dos resultados do conteúdo de clorofila c (mg/g de extrato seco), em relação às razões sólido: solvente (1:10 e 1:20 g:mL) para as extrações convencionais com duração de 1h (A) e 2h (B) a 25 °C, e 1h (C) e 2h (D) a 40 °C, juntamente com a comparação dos resultados do teor de clorofila c (mg/g de extrato seco) em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extrações com duração de 1h nas razões de 1:10 (E) e 1:20 (F) g:mL.

Na Figura 40 pode verificar-se que para os tempos de extração de 1h (Figura 40 A) e de 2h (Figura 40 B), a 25 °C, os solventes que permitiram a obtenção de valores mais elevados de clorofila c foram a mistura de solventes água: acetona, água: metanol, metanol e acetona. Para esses solventes, a

razão sólido: solvente 1:20 g:mL resultou, na maioria das condições, nos valores de clorofila *c* mais altos: $0,141 \pm 0,0080$ mg/ g de extrato seco (água: acetona, Figura 40 A), a mistura água: metanol (Figura 40 A) $0,361 \pm 0,0024$ mg/g de extrato seco (água: metanol, Figura 40 A), e $0,256 \pm 0,038$ mg/ g de extrato seco (metanol, Figura 40 A). Por outro lado, a acetona possibilitou a obtenção de um maior conteúdo de clorofila *c* no rácio de 1:10 g:mL sendo que o seu valor foi de $0,276 \pm 0,021$ mg/ g de extrato seco (Figura 40 A).

Quando se comparam os resultados dos teores de clorofila *c* para os tempos de extração de 1h (Figura 40 C) e de 2h (Figura 40 D), a 40 °C, os solventes que permitiram a obtenção de melhores resultados foram a mistura de solventes água: acetona, água: etanol, o etanol e a acetona (Figura 40 C), no qual para tempos de extração de 2h, foram obtido conteúdos relativamente mais baixos quando comparados com as extrações de 1h. No tempo de extração de 1h, contrariamente ao que foi verificado nos resultados anteriores, para a mistura de solventes como a água: acetona e água: etanol, foram obtidos melhores valores relativos de clorofila *c* quando se utilizou uma razão de 1:10, apresentando respetivamente valores de $0,314 \pm 0,051$ e $0,261 \pm 0,018$ mg/ g de extrato seco. No entanto, para os solventes etanol e acetona, a utilização de uma razão sólido: solvente de 1:20 g:mL, possibilitou a obtenção dos melhores resultados em termos do conteúdo de clorofila *c*, apresentando respetivamente valores de $0,562 \pm 0,0048$ e $0,273 \pm 0,030$ mg/ g de extrato seco.

Por fim, a comparação dos resultados apresentados na Figura 40 E e Figura 40 F, em termos da temperatura de extração, permite comprovar que os solventes que resultam em teores de clorofila *c* mais altos são a mistura de solventes água: acetona, água: etanol, água: metanol, metanol e acetona, com uma temperatura de extração de 40 °C. No caso da mistura de solventes água: acetona, água: etanol, e do metanol, os melhores resultados para a mesma temperatura, foram obtidos pela utilização da razão de 1:10 g:mL, e apresentaram, respetivamente, valores de $0,314 \pm 0,051$, $0,261 \pm 0,018$ e $0,317 \pm 0,041$ mg de clorofila *c*/ g de extrato seco. Por outro lado, a mistura de solventes água: metanol e a acetona, apresentaram os melhores conteúdos de clorofila *c* para a razão de 1:20 g:mL, com os respetivos resultados de $0,361 \pm 0,013$ e $0,562 \pm 0,0048$ mg clorofila *c*/ g de extrato seco.

Garcia-Perez et al., 2022 referem que para a *U. pinnatifida* uma extração realizada com o etanol permite a obtenção de $0,851$ mg/g de extrato seco de clorofila *c*, e no caso da utilização da acetona como solvente, $0,0352$ mg/g de extrato seco. Pela comparação dos resultados obtidos com a literatura, pode-se verificar que a utilização do etanol para as extrações realizadas na *U. pinnatifida* (Figura 40 C), permitiu obter valores de clorofila *c* menores ($0,273 \pm 0,030$ mg/g de extrato seco). Por outro lado, o conteúdo de clorofila *c* do extrato acetónico (Figura 40 C) foi mais elevado ($0,562 \pm 0,0048$ mg/g de extrato seco) em comparação com a literatura (Garcia-Perez et al., 2022).

Também segundo Garcia-Perez et al., 2022, o conteúdo de clorofila *c* na *U. pinnatifida*, extraído com o solvente etanol ($0,851$ mg/g de extrato seco), é maior quando comparado com o extraído com os mesmos solventes nas algas como a *H. elongata*, uma vez que o solvente etanol permitiu a extração de $0,6764$ mg/ g de extrato seco de clorofila *c* na *H. elongata*. Contrariamente, a acetona permitiu a extração de $0,2065$ mg/ g de extrato seco de clorofila *c* na *H. elongata*, valor este superior ao que foi extraído da *U. pinnatifida* ($0,0352$ mg/g de extrato seco).

O teor de clorofila *c* obtido a partir da extração com etanol e acetona, apresenta uma tendência contrária ao que ocorreu relativamente ao conteúdo de clorofila *a*, na medida em que neste caso, o etanol possibilitou a obtenção de um maior teor de clorofila *c* quando comparado com a acetona. Isto pode ser verificado tanto nos resultados obtidos neste trabalho para a *U. pinnatifida*, como para os dados da literatura, Garcia-Perez et al., 2022, para a mesma alga e para a *H. elongata*.

4.1.3.3. Conteúdo de Clorofilas Totais

O teor de clorofilas totais foi calculado através da equação 4, através dos valores das absorvâncias lidas nos comprimentos de onda de 632, 652, 665, 696 e 750 nm. O conteúdo de clorofilas totais, em mg/g de extrato seco, relativos às diferentes condições de extração estão representados na Figura 41.

De um modo semelhante ao que foi mencionado anteriormente, a Figura 41 apresenta os resultados relativos aos valores de clorofilas totais em relação a todas as extrações realizadas a 25 °C e razões de 1:10 e 1:20 g:mL, para os tempos de extração de 1h (Figura 41 A) e 2h (Figura 41 B), os resultados relativos ao conteúdo de clorofilas totais em relação a todas as extrações realizadas a 40 °C e razões de 1:10 e 1:20 g:mL, para os tempos de extração de 1h (Figura 41 C) e 2h (Figura 41 D), e a comparação dos resultados em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extrações com duração de 1h nas razões de 1:10 (Figura 41 E) e 1:20 g:mL (Figura 41 F).

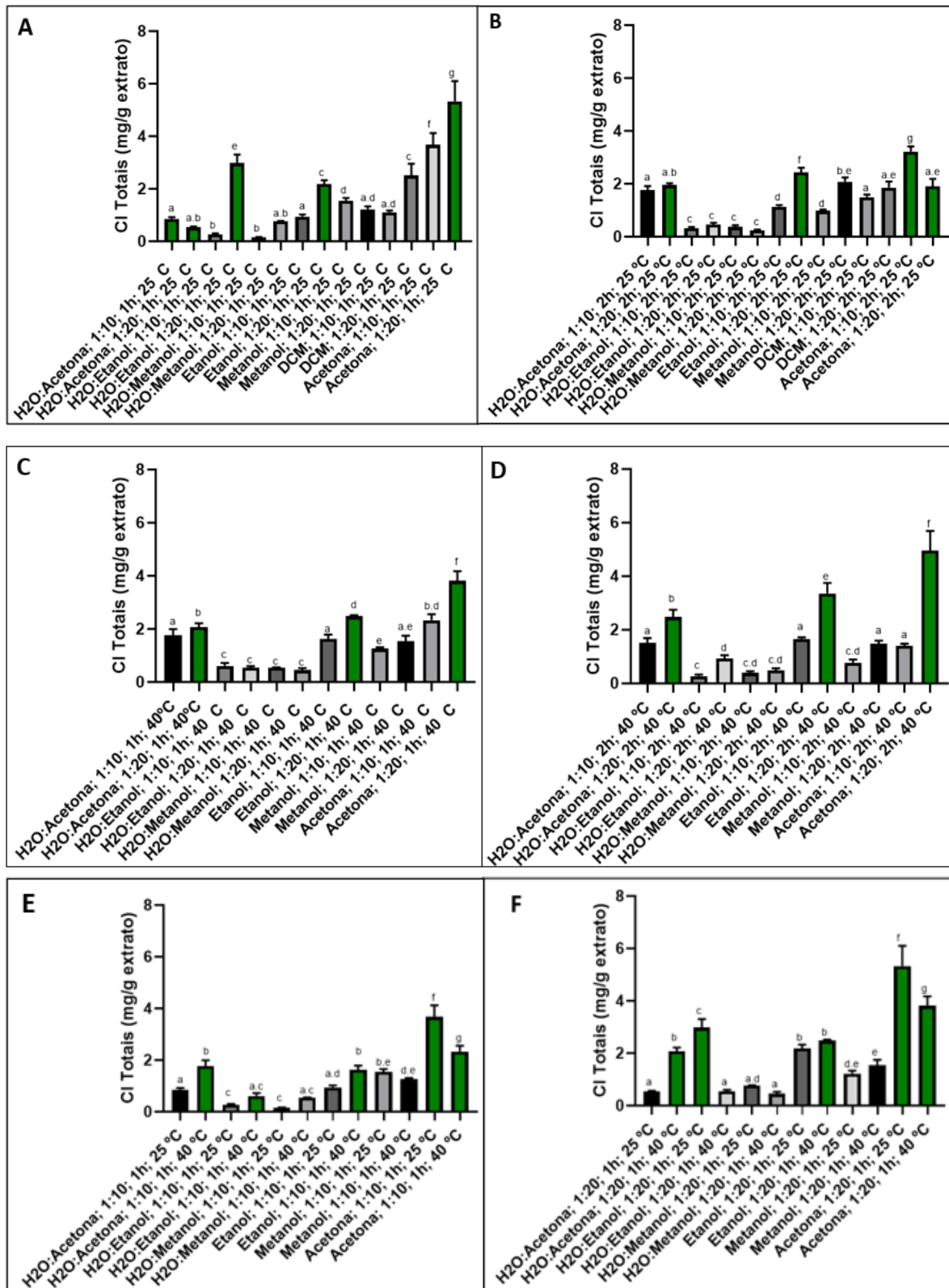


Figura 41. Comparação dos resultados do conteúdo de clorofilas totais (mg/g de extrato seco), em relação às razões (1:10 e 1:20 g/ml) para as extrações convencionais com duração de 1h (A) e 2h (B) a 25 °C, e 1h (C) e 2h (D) a 40 °C, juntamente com a comparação dos resultados do teor de clorofilas totais (mg/g de extrato seco) em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extrações com duração de 1h nas razões de 1:10 (E) e 1:20 (F) g:mL.

Na Figura 41 pode verificar-se que para os tempos de extração de 1h (Figura 41 A) e de 2h (Figura 41 B), a 25 °C, os solventes que permitiram obter melhores resultados em relação ao teor de

clorofilas totais, foram a mistura de solventes água: acetona, água: etanol, etanol e acetona. Para esses solventes, a razão de 1:20 g:mL possibilitou, na maioria das condições, a obtenção de melhores resultados, dado que o uso da mistura água: etanol (Figura 41 A) resultou num valor de $2,98 \pm 0,32$ mg/g extrato seco, com o etanol $2,18 \pm 0,15$ mg/g de extrato seco, e com a acetona $5,33 \pm 0,78$ mg/g de extrato seco. Por outro lado, para a mistura de solventes água: acetona (Figura 41 A) verificou-se um maior conteúdo de clorofilas totais na razão de 1:10 g:mL sendo que o seu valor foi de $0,860 \pm 0,0059$ mg/ g de extrato seco.

Quando se comparam os valores de clorofilas totais para os tempos de extração de 1h (Figura 41 C) e de 2h (Figura 41 D), a 40 °C, resultados os melhores solventes foram a mistura de solventes água: acetona, o etanol e a acetona (Figura 41 C). Em todos os casos, uma razão de 1:20 g:mL possibilitou a obtenção de resultados mais altos de clorofilas totais, sendo que para a mistura de solventes água: acetona foi obtido um conteúdo de clorofilas totais em mg/ g de extrato seco de $2,07 \pm 0,14$, para a extração realizada com etanol de $2,49 \pm 0,037$, e para a acetona $3,81 \pm 0,37$.

Por fim, pela análise da Figura 41 E e Figura 41 F é possível comprovar que a utilização da mistura de solventes água: acetona, o etanol e a acetona (Figura 41 F) permitem atingir teores mais elevados em clorofilas totais a 40 °C e nas razões de 1:20 g:mL, com valores de $2,07 \pm 0,14$, $2,49 \pm 0,037$ e $3,81 \pm 0,37$ mg / g de extrato seco, respetivamente. Já a mistura de solventes água: etanol (Figura 41 F) apresentou maiores quantidades de clorofilas totais a uma temperatura de 25 °C ($2,98 \pm 0,32$ mg/ g de extrato seco).

De acordo com Garcia-Perez et al., 2022, na *U. pinnatifida* foi quantificado um conteúdo de clorofilas totais de 0,9113 e 0,8839 mg/ g de extrato seco, para extrações realizadas com o etanol e acetona, respetivamente. À semelhança do que foi verificado anteriormente, também no caso das clorofilas totais, os resultados obtidos na realização deste trabalho foram mais elevados do que os mencionados na literatura para os mesmos solventes ($2,49 \pm 0,037$ e $3,81 \pm 0,37$ mg/ g de extrato seco, para o etanol e acetona, respetivamente). Para além disso, foi possível verificar que contrariamente ao demonstrado na literatura, a acetona como solvente de extração permite a obtenção de maiores teores de clorofilas totais.

No mesmo estudo (Garcia-Perez et al., 2022), mas em relação a outras algas marinhas, tais como, a *H. elongata* e *L. ochroleuca*, o uso de etanol como solvente de extração resultou num teor de clorofilas totais de 1,9283 e 1,2844 mg/ g de extrato seco, respetivamente. A acetona como solvente, apresentou valores de clorofilas totais de 1,6730 e 1,5031 mg/ g de extrato seco, para a *H. elongata* e *L. ochroleuca*, respetivamente. Segundo a literatura analisada, as algas *H. elongata* e *L. ochroleuca* apresentaram maiores valores de clorofilas totais comparativamente à *U. pinnatifida* (0,9113 e 0,8839 mg/ g de extrato seco). Nestas algas, também à semelhança do que foi verificado na literatura para a *U. pinnatifida*, o etanol possibilitou a extração de maiores teores de clorofilas totais. Para além disso, os teores de clorofilas totais obtidos neste trabalho para os extratos de *U. pinnatifida* foram superiores aos verificados para os dois exemplos de algas marinhas da literatura (Garcia-Perez et al., 2022).

4.1.3.4. Conteúdo de Carotenoides

O teor de carotenoides foi calculado através da equação 5, através dos valores das absorvâncias lidas no comprimento de onda de 480 nm. Os resultados foram convertidos em mg de carotenoides/ g de extrato seco e os valores de carotenoides relativos às diferentes condições de extração estão representados na Figura 42.

A Figura 42 apresenta os resultados relativos ao teor de carotenoides em relação a todas as extrações realizadas a 25 °C e razões de 1:10 e 1:20 g:mL, para os tempos de extração de 1h (Figura 42 A) e 2h (Figura 42 B), e para 40 °C e razões de 1:10 e 1:20 g:mL, para os tempos de extração de 1h (Figura 42 C) e 2h (Figura 42 D). Adicionalmente, é feita a comparação dos resultados em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extrações com duração de 1h nas razões de 1:10 (Figura 42 E) e 1:20 g:mL (Figura 42 F).

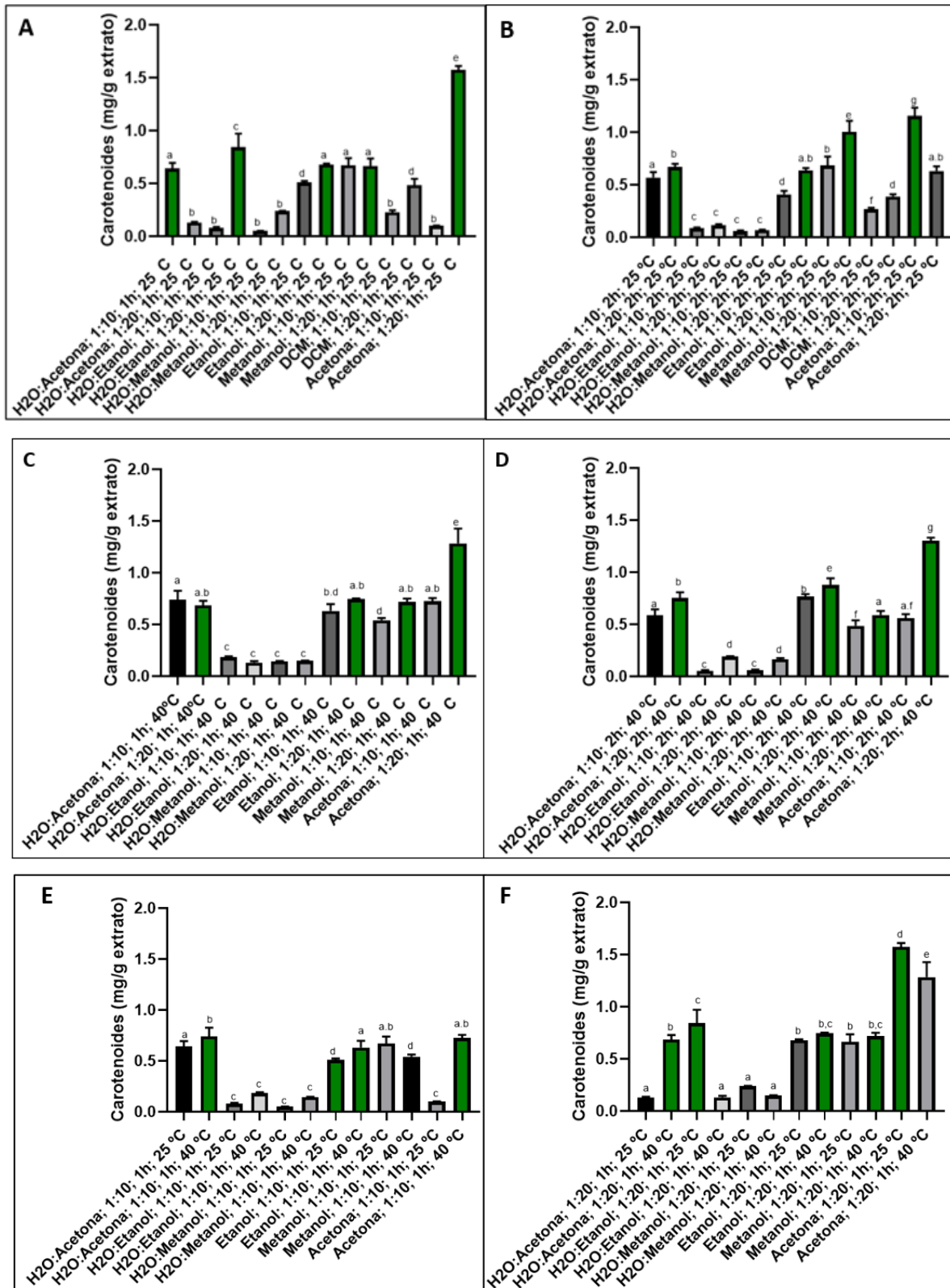


Figura 42. Comparação dos resultados do conteúdo de carotenoides (mg/g de extrato seco), em relação às razões (1:10 e 1:20 g:mL) para as extrações convencionais com duração de 1h (A) e 2h (B) a 25 °C, e 1h (C) e 2h (D) a 40 °C, juntamente com a comparação dos resultados do teor de carotenoides (mg/g de extrato seco) em função da temperatura (25 °C vs 40 °C) para as extrações com duração de 1h nas razões de 1:10 (E) e 1:20 (F).

Pela análise da Figura 42 pode verificar-se que para os tempos de extração de 1h (Figura 42 A) e de 2h (Figura 42 B), a 25 °C, a mistura de solventes água: acetona, água: etanol, etanol, metanol e

acetona resultaram em conteúdos de carotenoides mais altos.. Para esses solventes, a razão sólido: solvente de 1:20 g:mL possibilitou, na maioria das condições, a obtenção de melhores resultados: a mistura água: etanol (Figura 42 A) apresentou um teor de $0,84 \pm 0,13$, o etanol de $0,68 \pm 0,0083$, o metanol de $0,67 \pm 0,069$ e a acetona $1,57 \pm 0,038$ mg/g de extrato seco. Por outro lado, a mistura de solventes água: acetona (Figura 42 A) traduziu-se num maior teor de carotenoides na razão de 1:10 g:mL sendo que o seu valor foi de $0,64 \pm 0,053$ mg/ g de extrato seco.

Quando se analisam os teores de carotenoides para os tempos de extração de 1h (Figura 42 C) e de 2h (Figura 42 D), a 40 °C, os solventes que permitiram a obtenção de melhores resultados foram a mistura de solventes água: acetona, o etanol, o metanol e a acetona (Figura 42 C). Na maioria dos casos, uma razão de 1:20 g:mL resultou em valores mais elevados de carotenoides. A utilização do etanol permitiu obter um teor de carotenoides de $0,74 \pm 0,0070$ mg/ g de extrato seco, para o metanol $0,72 \pm 0,033$ e para a acetona $1,28 \pm 0,14$. Na mistura água: acetona, ao contrário dos restantes solventes, o valor mais elevado de carotenoides foi obtido para a razão de 1:10 g:mL com um valor de $0,74 \pm 0,085$ mg/ g de extrato seco.

Finalmente, as Figura 42 E e a Figura 42 F comprovam que a utilização da mistura de solventes água: acetona, o etanol e o metanol (Figura 42 F) permitem a obtenção de maior quantidade de carotenoides a 40 °C, com os respetivos valores de $0,74 \pm 0,085$, $0,74 \pm 0,0070$ e $0,72 \pm 0,033$ mg / g de extrato seco. Já a mistura de solventes água: acetona (Figura 42 E) e acetona (Figura 42 F) apresentaram teores mais elevados de carotenoides a uma temperatura de 25 °C com valores de $0,84 \pm 0,13$ e $1,57 \pm 0,038$ mg/ g de extrato seco, respetivamente.

Garcia-Perez et al., 2022 referem que para os solventes etanol e acetona os teores de carotenoides totais na *U. pinnatifida* foram de 2,8398 e 2,7924 mg/ g de extrato seco, respetivamente. No entanto, nas extrações realizadas neste trabalho para os mesmos solventes, foram obtidos menores teores de carotenoides totais ($0,74 \pm 0,007$ e $1,57 \pm 0,038$ mg/ g de extrato seco, em relação ao etanol e acetona, respetivamente).

Garcia-Perez et al., 2022, também referem que as algas marinhas *H. elongata* e *L. ochroleuca*, apresentam maiores conteúdos de carotenoides totais comparativamente à *U. pinnatifida*, na medida em que na extração com etanol é possível a obtenção de um teor de 6,1417 e 4,5719 mg/ g de extrato seco, e no caso da utilização da acetona como solvente da extração, 4,3287 e 5,6755 mg/ g de extrato seco, para cada uma das algas, respetivamente, comparando com os valores de 2,8398 e 2,7924 mg/ g de extrato seco, para a *U. pinnatifida*, no caso da utilização dos solventes etanol e acetona, respetivamente. Também neste caso, à semelhança do que foi verificado na literatura para o teor de clorofilas, as algas marinhas *H. elongata* e *L. ochroleuca* apresentam maiores teores de carotenoides totais comparativamente à *U. pinnatifida*.

Resumidamente, Garcia-Perez et al., 2022 referem que os melhores solventes a utilizar numa extração a 50 °C, na razão 1:30 g:mL são o etanol e a acetona para a extração de clorofilas e carotenoides para a *U. pinnatifida* e a para a maioria das algas marinhas estudadas. Por outro lado, em termos do TPC, Xie et al., 2021 referem que para uma extração a 25 °C, também na razão 1:30 g:mL os melhores solventes a utilizar são a água: etanol e água: acetona (30:70 v/v). Ou seja, segundo estes autores, os melhores solventes a utilizar para a extração de compostos bioativos da *U. pinnatifida* (TPC, clorofilas a, c e totais e carotenoides totais) são o etanol, a acetona, água: etanol e água: acetona.

Considerando todos os resultados obtidos (rendimento, TPC, carotenoides e clorofilas), pode-se concluir que apesar dos melhores rendimentos terem sido obtidos para uma extração com metanol na razão de 1:20 g:mL a 40 °C, os solventes ou mistura de solventes que permitem de uma forma global

uma extração otimizada de compostos antioxidantes são a água: acetona, água: etanol, etanol e acetona na razão de 1:20 g:mL a 40 °C. Apesar das ligeiras diferenças nas extrações mencionadas na literatura, em termos das razões sólido/líquido, razões volume/volume das misturas de solventes e temperaturas de extração, verifica-se que os melhores solventes a utilizar são o etanol, a acetona, água: etanol e água: acetona, à semelhança do que foi verificado neste trabalho (Garcia-Perez et al., 2022; Xie et al., 2021).

Em termos dos tempos de extração, verificou-se na avaliação do TPC, clorofilas *a*, *c* e totais, e carotenoides, que o aumento do tempo de extração de 1h para 2h, na generalidade não apresentou uma tendência constante no aumento dos teores obtidos, ou seja, não afetou positivamente os resultados de forma significativa. Isto pode dever-se ao facto de existir saturação praticamente total dos solventes ao fim de 1h de extração, ou devido à evaporação parcial dos solventes durante tempos mais longos de extração e a temperaturas mais elevadas.

De acordo com estes resultados decidiu-se que as condições a ser usadas para a MAE seriam a mistura de solventes água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v), uma razão de 1:40 g:mL e uma temperatura de extração de 40 °C. Em relação ao tempo de extração, a utilização de 1 ou 2 horas serviram como base para a observação do comportamento das extrações em função do tempo, que neste caso não apresentaram influência significativa nos resultados obtidos. Por esse motivo foi escolhido como tempo de extração de 30 min para a MAE, tendo em conta a eficiência da extração nestas condições em tempos mais curtos (Delazar et al., 2012; Matos et al., 2021; Tsukui & Rezende, 2014).

4.2. Seleção das Condições Ótimas de Extração – Extrações Convencionais vs MAE

De forma a otimizar a extração por MAE, usando os solventes selecionados (água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v)) foram ainda realizadas extrações convencionais semelhantes às anteriores, no entanto com a utilização de uma razão sólido: solvente de 1:40 g:mL, de modo a testar se a utilização destes solventes nestas condições permitiriam obter melhores resultados a nível do rendimento de extração, do TPC e dos teores de carotenoides e clorofilas. Ao mesmo tempo, foi também realizada uma MAE teste com água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v), a 40 °C também no rácio de 1:40 de modo a obter resultados comparativos com os da extração convencional nas mesmas condições. Para além disso, de modo a avaliar a eficiência da MAE, usou-se um tempo de extração de 30 min, enquanto as extrações convencionais foram realizadas durante 1h.

4.2.1. Rendimento das Extrações Convencionais vs MAE

Em termos de rendimento (%), a Figura 43 apresenta a comparação entre as extrações convencionais e MAE realizadas nas condições de 1:40 a 40 °C, e para tempos de extração de 1h, no caso das extrações convencionais, e 30 min, no caso das MAE.

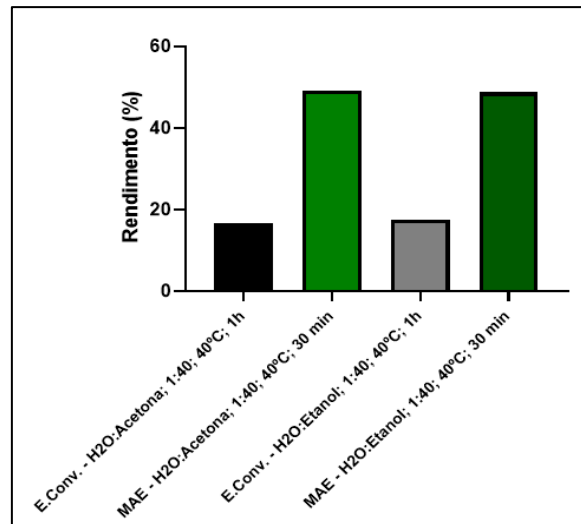


Figura 43. Comparação dos rendimentos obtidos (%) entre as extrações convencionais (E.Conv.) e extrações assistidas por micro-ondas (MAE) com os solventes água: acetona e água: etanol na razão sólido: solvente de 1:40 g:mL, temperatura de 40 °C e tempos de extração de 1h (E.Conv.) e 30 min (MAE).

A realização das extrações convencionais numa razão sólido: solvente de 1:40 g:mL, com a utilização dos solventes otimizados para a obtenção de melhores resultados a nível do TPC e clorofilas e carotenoides, tais como a água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v) a 40 °C, durante 1h, permitiu verificar que o aumento da razão sólido: solvente de 1:20 para 1:40 g:mL permitiu atingir melhores valores de rendimento, na medida em que nas extrações realizadas numa razão de 1:20 g:mL foram obtidos valores de rendimento de 13,8 % e 16,8 %, enquanto que para as extrações realizadas em razões de 1:40 g:mL foram obtidos rendimentos de 16,5 % e 17,5 %, respetivamente para as extrações realizadas a 40 °C durante 1h, com os solventes água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v).

Para além disso, quando se comparam os rendimentos obtidos para razões sólido: solvente de 1:10 e 1:40 g:mL, para os mesmos solventes e condições de temperatura, verifica-se que as variações são mais significativas, uma vez que em relação às extrações nas razões 1:10 g:mL foram obtidos rendimentos de 11,3 % (-5,2 %) e 11,2 % (-6,3 %), respetivamente para as extrações realizadas a 40 °C durante 1h, com os solventes água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v).

De uma forma geral conclui-se que o aumento da razão sólido: solvente para 1:40 g:mL possibilitou a obtenção de melhores rendimentos de extração, e por isso essa foi a selecionada para a utilização nas MAE.

Analisando a Figura 43 na qual se encontram representados os rendimentos das extrações convencionais e MAE, pode-se verificar que as MAE apresentaram os rendimentos mais elevados, com valores, respetivamente, de 49,2 % e 48,7%, quando comparadas com as extrações convencionais realizadas nas mesmas condições de razão sólido: solvente e temperaturas que apresentaram rendimentos de 16,5 % e 17,5 %, com as misturas de solventes água: acetona e água: etanol, respetivamente. Através destas comparações pode-se comprovar a eficiência das MAE, dado que mesmo para tempos de extração menores do que os usados para as extrações convencionais, os rendimentos foram superiores com variações de 32,7 % no caso das extrações realizadas com a mistura de solventes água: acetona, e 31,2 % no caso das extrações realizadas com a mistura de solventes água: etanol.

4.2.2. TPC das Extrações Convencionais vs MAE

A Figura 44 apresenta os resultados comparativos do TPC obtidos nas extrações convencionais e MAE realizadas nas condições de 1:40 g:mL a 40 °C, e para tempos de extração de 1h, no caso das extrações convencionais, e 30 min, no caso das MAE.

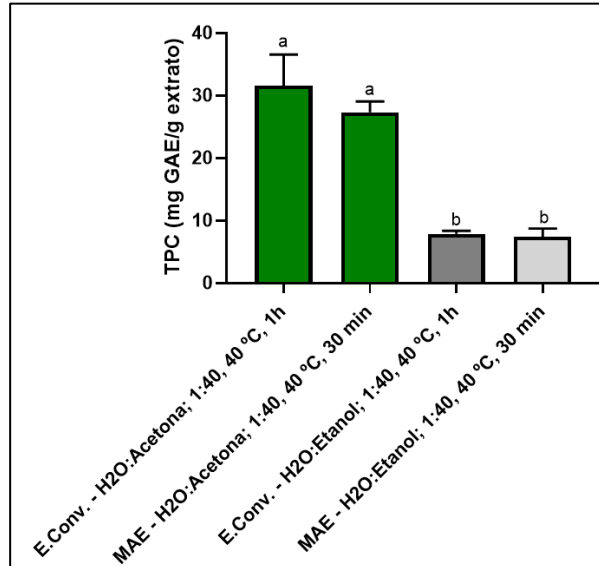


Figura 44. Comparação dos resultados TPC (mg GAE/g extrato seco) entre as extrações convencionais (E.Conv.) e extrações assistidas por micro-ondas (MAE) com os solventes água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v) na razão sólido: solvente de 1:40 g:mL, temperatura de 40 °C e tempos de extração de 1h (E.Conv.) e 30 min (MAE).

A realização das extrações convencionais numa razão sólido: solvente de 1:40 g:mL, com a utilização dos solventes otimizados para a obtenção de melhores resultados a nível do TPC e clorofilas e carotenoides, tais como a água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v) a 40 °C, durante 1h, permitiu verificar que o aumento da razão sólido: solvente de 1:20 para 1:40 g:mL traduziu-se em valores mais altos de TPC, uma vez que nas extrações realizadas numa razão de 1:20 g:mL foram obtidos teores de TPC de $11,4 \pm 2,6$ e $2,19 \pm 0,30$ mg GAE/ g extrato seco, enquanto que nas extrações realizadas em razões de 1:40 g:mL foram obtidos valores TPC de $27,3 \pm 1,7$ e $7,86 \pm 0,47$ mg GAE/ g extrato seco, respetivamente, para as extrações realizadas a 40 °C durante 1h, com os solventes água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v). De uma forma geral verificou-se que o aumento da razão sólido: solvente para 1:40 g:mL possibilitou a obtenção de melhores rendimentos de extração, e por isso essa foi a razão selecionada para a utilização nas MAE.

Pela análise da Figura 44 pode-se verificar que ao contrário do que aconteceu em relação ao rendimento, no qual a MAE apresentou resultados superiores quando comparada com as extrações convencionais, os valores de TPC em mg GAE/ g extrato seco não apresentam variações significativas quando se compararam as extrações convencionais com as MAE. Para a mistura de solventes água: acetona para ambos os tipos de extrações, a análise ANOVA revelou um $p\ value = 0,0586$, e no caso da mistura de solventes água: etanol um $p\ value = 0,9885$. Para além disso é também possível verificar que as extrações com a mistura de solventes água: acetona possibilita a obtenção dos melhores resultados do TPC para a extração convencional e MAE, apresentando valores de $31,6 \pm 4,9$ e $27,3 \pm 1,7$ mg GAE/g extrato seco, respetivamente.

Félix, 2017 e Patra et al., 2017, extraíram compostos antioxidantes da alga *U. pinnatifida* usando MAE resultando num extrato com valores de TPC de 65,36 mg GAE/g extrato seco, quando realizada com água, na razão 1:10 g:mL e durante 240 min. Estes autores obtiveram resultados de TPC cerca de

2 vezes superior ao obtido na MAE realizada neste trabalho com água: acetona (10:90 v/v) na razão 1:40 g:mL e durante 30 min. O uso de água implica a extração de compostos antioxidantes hidrossolúveis tais como compostos fenólicos típicos das algas castanhas tais como florotaninos (Félix, 2017 e Patra et al., 2017). Para outras espécies de algas, tais como para a alga marinha *Sargassum muticum*, foi reportado um valor TPC de 30 mg GAE/g extrato seco quando extraída com MAE, com água: etanol (50:50 v/v) durante 30 min, (Félix, 2017).

4.2.3. Conteúdo de Carotenoides e Clorofilas das Extrações Convencionais vs MAE

Em relação ao teor de carotenoides e clorofilas, a Figura 45 apresenta os resultados comparativos para a clorofila *a*, clorofila *c*, clorofilas totais e carotenoides em mg/ g de extrato seco, obtidos nas extrações convencionais e MAE realizadas nas condições de 1:40 g:mL a 40 °C, e para tempos de extração de 1h, no caso das extrações convencionais, e 30 min, no caso das MAE.

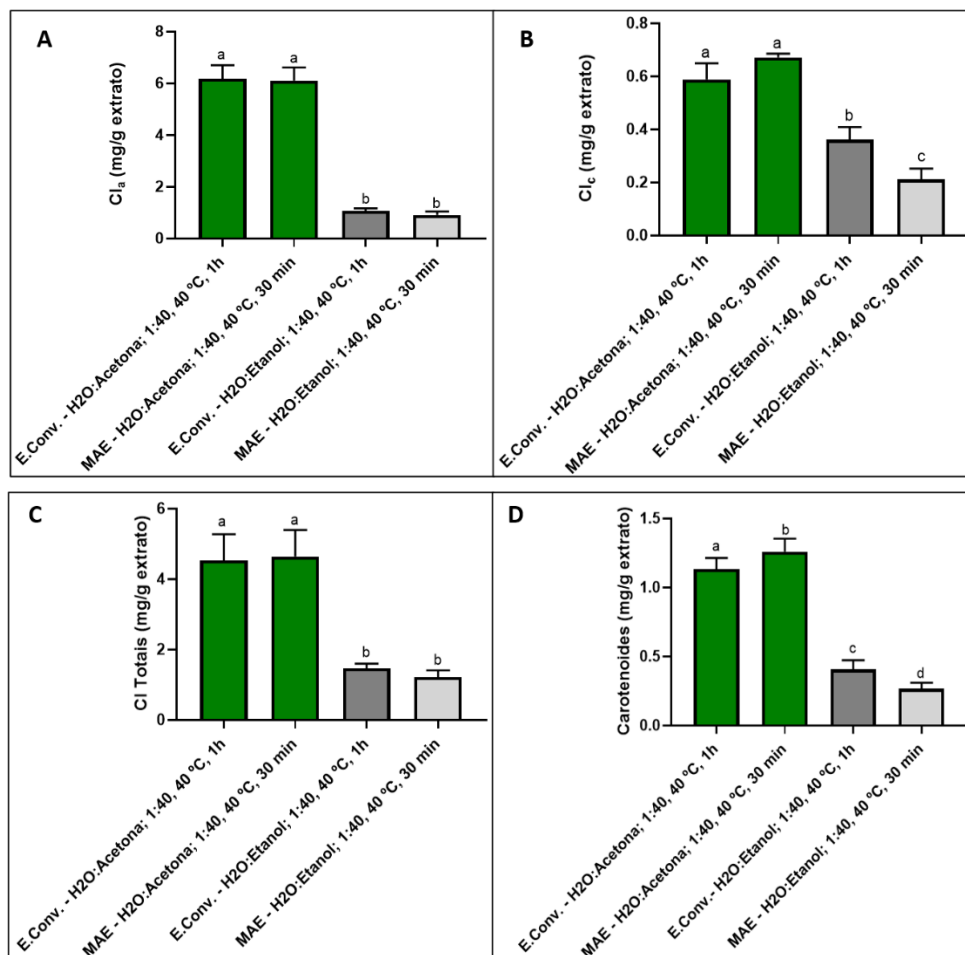


Figura 45. Comparação dos resultados do conteúdo de clorofila *a* (A), clorofila *c* (B), clorofilas totais (C) e carotenoides (D) (mg/g extrato seco) entre as extrações convencionais (E.Conv.) e extrações assistidas por micro-ondas (MAE) com os solventes água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v) na razão sólido: solvente de 1:40 g:mL, temperatura de 40 °C e tempos de extração de 1h (E.Conv.) e 30 min (MAE).

Também neste caso, a realização das extrações convencionais numa razão sólido: solvente de 1:40 g:mL, com a utilização dos solventes otimizados para a obtenção de melhores resultados a nível do TPC e clorofilas e carotenoides, tais como a água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v) a 40 °C,

durante 1h, permitiu verificar que o aumento da razão sólido: solvente de 1:20 para 1:40 g:mL possibilitou a obtenção de melhores valores de clorofilas *a*, *c*, totais e carotenoides, em mg/ g extrato seco.

Em relação à clorofilas *a*, verificou-se que para a razão 1:20 g:mL obtiveram-se teores de $2,52 \pm 0,14$ e $0,280 \pm 0,021$ mg/g de extrato seco de clorofila *a*, enquanto que no caso da razão de 1:40 g:mL os valores foram de $6,17 \pm 0,53$ e $1,07 \pm 0,10$ mg/g de extrato seco de clorofila *a*, respetivamente para os solventes água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v) a 40 °C, durante 1h.

No caso da clorofilas *c*, verificou-se que para a razão 1:20 g:mL obtiveram-se teores de $0,120 \pm 0,010$ e $0,159 \pm 0,027$ mg/g de extrato seco de clorofila *c*, enquanto que na razão de 1:40 g:mL os valores foram $0,590 \pm 0,062$ e $0,360 \pm 0,0047$ mg/g de extrato seco de clorofila *c*, respetivamente para os solventes água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v) a 40 °C, durante 1h.

Em relação às clorofilas totais, verificou-se que para a razão 1:20 g:mL obtiveram-se teores de $2,07 \pm 0,14$ e $0,550 \pm 0,054$ mg/g de extrato seco de clorofilas totais, enquanto no caso da razão de 1:40 g:mL alcançaram-se valores de $4,53 \pm 0,74$ e $1,46 \pm 0,14$ mg/g de extrato seco de clorofilas totais, respetivamente para os solventes água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v) a 40 °C, durante 1h.

Por fim, relativamente aos carotenoides, verificou-se que para a razão 1:20 g:mL os teores foram $0,680 \pm 0,044$ e $0,130 \pm 0,012$ mg/g de extrato seco, enquanto no caso da razão de 1:40 g:mL obtiveram-se teores de $1,13 \pm 0,082$ e $0,405 \pm 0,066$ mg/g de extrato seco, respetivamente para os solventes água: acetona (10:90 v/v) e água: etanol (50:50 v/v) a 40 °C, durante 1h.

De uma forma geral verificou-se que o aumento da razão sólido: solvente para 1:40 g:mL possibilitou a obtenção de maiores teores de clorofilas *a,c* e totais e carotenoides, e por isso essa foi a selecionada para a utilização nas MAE.

De forma semelhante ao que foi verificado em relação aos resultados para o TPC, a análise da Figura 45 revelou que o conteúdo de clorofilas e carotenoides, para a mesma mistura de solventes, não varia de forma significativa quando se comparam a extração convencional e MAE.

Em relação à clorofila *a* (Figura 45 A) obtiveram-se melhores resultados com a mistura de solventes água: acetona para ambos os tipos de extração, sendo que na extração convencional atingiu-se um teor de $6,17 \pm 0,53$ mg/ g de extrato seco, e na MAE $6,11 \pm 0,50$ mg/ g de extrato seco. Como já referido, estes valores não apresentam diferenças significativas (*p value* = 0,9900 calculado através de uma análise ANOVA). Em termos da mistura de solventes água: etanol a variação dos resultados obtidos entre a extração convencional e MAE também não apresentou diferenças significativas (*p value* = 0,8801).

Não foram encontrados trabalhos prévios sobre o teor de clorofila *a* na *U. pinnatifida* a partir de uma MAE, no entanto, segundo Garcia-Perez et al., 2022 comparando estes resultados com os valores de clorofila *a* obtidos por extrações convencionais com a acetona (0,773 mg/ g de extrato seco), verificou-se que através da MAE neste trabalho foram obtidos valores de clorofila *a* cerca de 8 vezes superiores aos da extração convencional reportada.

Quanto ao teor de clorofila *c* (Figura 45 B) é verificada a mesma tendência referida nos casos anteriores, ou seja, teores mais elevados de clorofila *c* foram obtidos através da realização das extrações com a mistura de solventes água: acetona, apresentando valores de $0,587 \pm 0,062$ mg/ g de extrato seco no caso da extração convencional, e $0,671 \pm 0,014$ mg/ g de extrato seco no caso da MAE. Também

estes resultados não apresentaram variações significativas quando se comparam os dois tipos de extração (p value = 0,2457).

Não foram encontrados dados prévios do teor de clorofila *c* obtidos por MAE da *U. pinnatifida*. No entanto, comparando os resultados com os obtidos por Garcia-Perez et al., 2022 usando extrações convencionais com a acetona (0,0352 mg/ g de extrato seco), conclui-se que através da MAE neste trabalho o valor de clorofila *c* é cerca de 19 vezes superior ao da extração convencional reportada na literatura.

Também em termos do teor de clorofilas totais (Figura 45 C), é verificada mais uma vez a mesma tendência, no qual os valores mais altos foram obtidos através da utilização da mistura de solventes água: acetona para ambos os tipos de extração, em que no caso da extração convencional foram descritos teores de $4,53 \pm 0,74$ mg/ g de extrato seco, e no caso da MAE $4,64 \pm 0,75$ mg/ g de extrato seco. Estes resultados também não apresentaram variações significativas (p value = 0,9721). Para a mistura de solventes água: etanol para ambos os tipos de extração também não se observaram diferenças significativas apresentando um p value = 0,7632.

Mais uma vez, não foi possível encontrar na literatura dados do teor de clorofilas totais na *U. pinnatifida* a partir de uma MAE, no entanto, verifica-se que através da MAE neste trabalho foram obtidos teores de clorofila total cerca de 5 vezes superior ao de um extrato acetónico (0.8839 mg/g de extrato seco) estudado por Garcia-Perez et al., 2022 .

Por fim, em relação aos carotenoides, a mistura de solventes água: acetona permitiu obter maiores quantidades, na medida em que em relação à extração convencional foram obtidos teores de $1,13 \pm 0,082$ mg/ g de extrato seco, e em relação à MAE $1,26 \pm 0,096$ mg/ g de extrato seco.

Segundo Matos et al., 2021, a utilização do etanol como solvente numa MAE com duração de 10 min a uma temperatura de 60 °C, resultou num teor de carotenoides de 1,093 mg/ g de extrato seco, a partir da *U. pinnatifida*. Este valor é superior ao obtido neste trabalho quando se usou água: etanol, e inferior quando se utilizou como solvente a mistura água: acetona.

Resumidamente, a análise das Figura 44 e Figura 45 permitiu verificar que de entre as misturas de solventes selecionadas, os melhores resultados foram observados para as extrações com a mistura de solventes água: acetona, a 40 °C na razão sólido: solvente de 1:40 g:mL, em comparação com a razão 1:20 g:mL. Para além disso, quando se realiza a comparação entre a utilização da extração convencional e MAE, verificou-se também que na maioria dos casos as diferenças obtidas nos resultados não apresentaram significância estatística. No entanto, é de notar que as extrações não foram realizadas com os mesmos tempos de extração, sendo que as MAE foram realizadas durante apenas 30 min, enquanto as extrações convencionais foram realizadas durante 1h. Isto significa que, quando se comparam os dois tipos de extração, apesar de terem sido obtidos resultados do TPC, do conteúdo de carotenoides e clorofilas, sem variações significativas, a MAE é mais eficiente em termos de rendimento e rapidez na realização destas extrações.

Todos os resultados apresentados nos capítulos 4.1 e 4.2, serviram para a seleção das condições a utilizar numa MAE em maiores escalas para a obtenção dos extratos de *U. pinnatifida* necessários para a realização dos restantes métodos de avaliação da atividade antioxidante e inibitória de enzimas, sendo selecionadas as misturas dos solventes água: acetona e água: etanol, na razão sólido: solvente 1:40 g:mL, e temperaturas e tempos de extração de 40 °C e 30 min.

Apesar das MAE realizadas a partir da utilização da mistura de solventes água: acetona terem apresentado os melhores resultados em termos de TPC, conteúdo de carotenoides e clorofilas, à medida

que iam sendo realizados os restantes ensaios para a avaliação da atividade antioxidante e inibição enzimática, verificou-se que existia uma grande dificuldade na dissolução dos extratos secos resultantes dessa extração, sendo na maioria dos casos mesmo impossível a sua dissolução nas soluções/ solventes necessários à realização de cada método. Quando se usa acetona a quantidade de carotenoides e clorofilas aumenta substancialmente em comparação com a extração com água: etanol. Estes pigmentos são de um modo geral insolúveis em solventes polares o que pode explicar a baixa solubilidade dos extratos obtidos com a acetona (Pangestuti & Siahaan, 2018).

Assim sendo, o extrato seco resultante da MAE com a mistura dos solventes água: acetona foi excluído dos restantes ensaios *in vitro* (avaliação do sequestro dos radicais DPPH[•], ABTS^{•+}, O₂^{•-}, [•]NO e [•]OH, e na avaliação da inibição enzimática da AChE, BuChE e tirosinase), e *in vivo* (avaliação do desenvolvimento do peixe-zebra). Ou seja, os seguintes resultados são referentes apenas ao extrato seco resultante da MAE com a mistura de solventes água: etanol (TPC = 7,39 ± 1,33 mg GAE/g extrato seco, clorofila *a* = 0,90 ± 0,13 mg/g extrato seco, clorofila *c* = 0,21 ± 0,040 mg/ g extrato seco, clorofilas totais = 1,21 ± 0,19 mg/g extrato seco e carotenoides = 0,26 ± 0,044 mg/ g extrato seco).

4.3. Ensaios *in vitro*: Avaliação da Atividade Antioxidante do extrato de *U. pinnatifida*

A avaliação da capacidade antioxidante do extrato de *U. pinnatifida* é uma etapa importante para determinar se o mesmo pode apresentar aplicabilidade e efeitos benéficos no tratamento e prevenção das doenças neurodegenerativas, como a DA, DP e depressão, na medida em que, como referido previamente, o stress oxidativo é uma das principais causas do aparecimento das mesmas. Assim sendo, a existência de um extrato com capacidade antioxidante permite a sua utilização para o controlo dos níveis de RNS/ROS causadoras do stress oxidativo. Para a avaliação da atividade antioxidante do extrato de *U. pinnatifida* foram estudadas a capacidade de sequestro dos radicais DPPH[•], ABTS^{•+}, [•]NO, O₂^{•-} e [•]OH, e os resultados obtidos para cada análise estão apresentados nos seguintes subcapítulos.

As curvas dose-resposta relativas à avaliação da atividade antioxidante do extrato de *U. pinnatifida* pelo sequestro dos radicais DPPH[•](A), ABTS^{•+}(B), [•]NO (C), O₂^{•-}(D) e [•]OH (E), estão representadas na Figura 46.

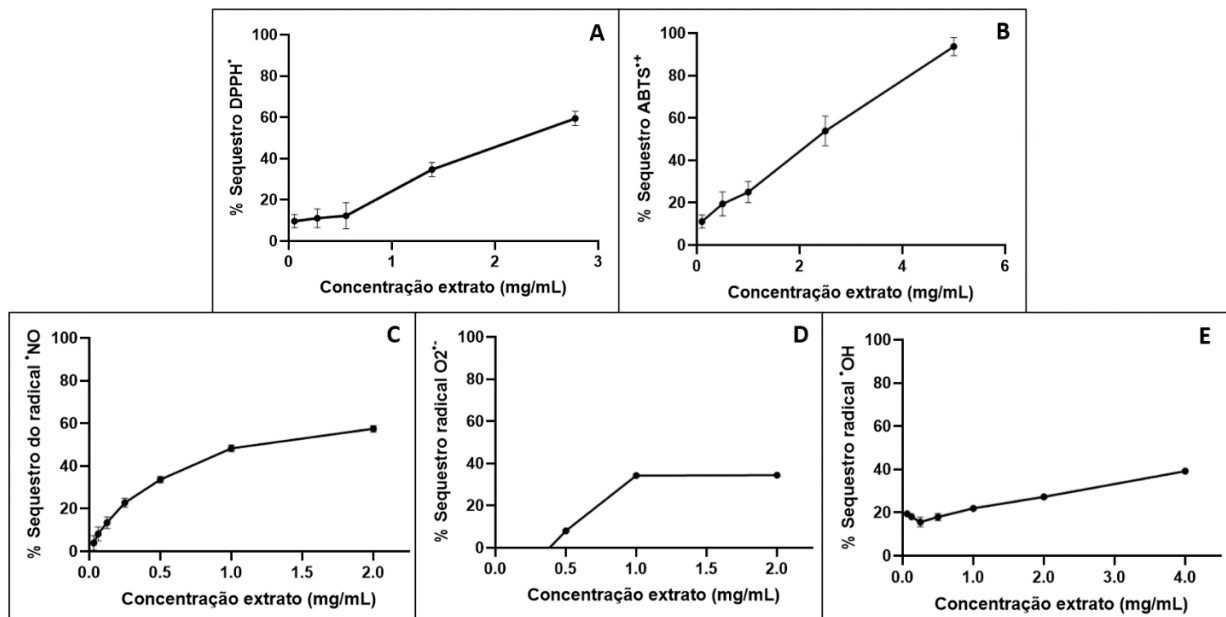


Figura 46. Curvas dose-resposta relativamente ao sequestro dos radicais DPPH•(A), ABTS•+(B), •NO (C), O₂•-(D) e •OH (E), em função das concentrações do extrato de *U. pinnatifida* de modo a avaliar a atividade antioxidante do extrato.

Pela análise da Figura 46, pode-se verificar que o extrato de *U. pinnatifida* apresenta atividade antioxidante, avaliada pelo sequestro do radical DPPH• (Figura 46 A), uma vez que este aumenta com o aumento da concentração do extrato chegando a atingir um sequestro de $59,4 \pm 3,5$ % para uma concentração de extrato de 2,78 mg/mL. O sequestro ou inibição de 50 % da concentração do radical DPPH• (IC₅₀) ocorreu a uma concentração de 2,25 mg/mL de extrato. O trolox foi usado como o controlo positivo com um IC₅₀ de 4,77 µg/mL.

Zeng et al., 2022, analisaram uma gama de concentrações de 0-0,50 mg/mL de extrato de *U. pinnatifida* e verificaram que para a concentração máxima (0,50 mg/mL), o extrato apresentava um sequestro de 80 % do radical DPPH, pelo que o IC₅₀ foi alcançado com uma concentração de 0,10 mg/mL. Esta elevada atividade antioxidante é explicada pelo facto de que os autores utilizaram água quente como solvente de extração, o que significa que existiu maior extração de compostos hidrossolúveis do que o verificado nas extrações realizadas neste trabalho (água: etanol 50:50 v/v), e por isso a presença de maior atividade antioxidante.

Outras espécies de algas marinhas como o *S. palidum*, mencionado por Xie et al., 2021, apresenta também uma forte atividade antioxidante, com um IC₅₀ = 0,275 mg/mL, em comparação com a obtida com o extrato de *U. pinnatifida* neste trabalho (2,25 mg/mL de extrato).

Relativamente à atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS•+ (Figura 46 B), também se pode verificar que o extrato apresenta capacidade de inibição, uma vez que a uma concentração de 5,0 mg/mL de extrato *U. pinnatifida* na microplaca, foi obtido um sequestro de $93,7 \pm 2,4$ % do radical ABTS•+, ou seja, foi possível a inibição de aproximadamente a totalidade do radical ABTS presente. Em termos de IC₅₀ verificou-se que a concentração de extrato necessária para o sequestro de 50 % da concentração do radical ABTS•+ presente foi de 2,30 mg/mL. O trolox foi usado como o controlo positivo com um IC₅₀ de 7,19 µg/mL.

De acordo com a literatura (Cho, 2017), uma concentração de extrato de 8,0 mg/mL da *U. pinnatifida* obtido através de uma extração UAE com etanol, possibilitou a obtenção de um sequestro do radical ABTS•+ de $37,87 \pm 2,02$ %, ou seja, para os valores de concentração reportados na literatura, não foi possível atingir pelo menos o IC₅₀. Isto significa que o extrato de *U. pinnatifida* utilizado neste

trabalho apresenta maior atividade antioxidante, uma vez que para além de se ter atingido o IC₅₀ a uma concentração de extrato de 2,30 mg/mL, uma concentração de 5,0 mg/mL possibilita um sequestro de $93,7 \pm 2,4$ % do radical ABTS^{•+}. Em comparação com outras algas marinhas, segundo os mesmos autores, a alga *Sargassum fusiforme*, em comparação com a *U. pinnatifida*, *E. linza* e *Porphyra tenera*, é a que apresenta maior capacidade de sequestro do radical ABTS^{•+}, com um sequestro de $61,80 \pm 4,66$ % para uma concentração de 8,0 mg/mL, sendo que as outras algas apresentam respetivamente valores de $37,87 \pm 2,02$, $22,24 \pm 2,27$ e $35,74 \pm 1,57$ %, para a mesma concentração de extrato. Neste caso, o extrato de *U. pinnatifida* utilizado neste trabalho apresenta uma maior atividade antioxidante do que a verificada na literatura para as restantes algas.

Os controlos positivos, como o nome indica são utilizados como referência de modo a demonstrar os valores de IC₅₀ que seriam obtidos por um composto com forte atividade antioxidante. Neste caso foi utilizado o trolox como controlo positivo e os seus IC₅₀ obtidos nas análises de atividade antioxidante com os radicais DPPH[•] e ABTS^{•+} apresentaram valores na ordem de grandeza dos microgramas (µg/mL). Assim sendo, pode-se constatar que o extrato de *U. pinnatifida* apresenta uma atividade antioxidante moderada no caso do sequestro destes radicais, uma vez que os valores de IC₅₀ obtidos em ambos os casos (sequestro dos radicais DPPH[•] e ABTS^{•+}) encontram-se na ordem de grandeza dos miligramas (mg/mL extrato). Caso o extrato apresentasse um IC₅₀ na mesma ordem de grandeza que os controlos positivos (µg/mL) seria considerado um bom antioxidante.

Os resultados relativos à avaliação da atividade antioxidante do extrato de *U. pinnatifida* no sequestro de radicais presentes no organismo humano tais como os radicais [•]NO, O₂^{•-} e [•]OH estão representados, respetivamente na Figura 46 C, Figura 46 D e Figura 46 E.

Através da análise da representação gráfica da Figura 46 C pode-se verificar um comportamento dose-resposta, no qual o extrato de *U. pinnatifida* para a concentração de 2,0 mg/ mL provocou o sequestro de $57,5 \pm 1,5$ % do radical [•]NO. Em termos de IC₅₀, o extrato de *U. pinnatifida* apresentou a capacidade de sequestrar ou inibir 50 % da concentração do [•]NO a uma concentração de 1,19 mg/mL, o que o torna um moderado antioxidante, uma vez que o ácido ascórbico usado como o controlo positivo, apresenta um IC₅₀ de 446,43 µg/mL (Soares et al., 2021).

De acordo com Cho, 2017, em relação ao sequestro do radical [•]NO por um extrato de *U. pinnatifida*, obtido por uma extração UAE com etanol, é descrito que para uma concentração máxima analisada de 8,0 mg/mL existe um sequestro do radical [•]NO de $28,34 \pm 2,19$ %. Em relação a este radical também não foi possível ser atingido o IC₅₀ ao contrário do que ocorreu no extrato de *U. pinnatifida* obtido e utilizado neste trabalho, na medida em que o mesmo foi atingido para uma concentração de extrato de 1,19 mg/mL. Relativamente a outras algas marinhas, é referido que a alga *S. fusiforme*, em comparação com a *U. pinnatifida*, *E. linza* e *P. tenera*, é a que apresenta maior atividade antioxidante no sequestro do radical [•]NO, na medida em que para a mesma concentração de extrato de 8,0 mg/mL é atingido um sequestro de $55,41 \pm 2,46$ % do radical. Já as restantes algas *E. linza* e *P. tenera*, apresentaram para a mesma concentração de extrato, um sequestro de $21,79 \pm 1,79$ e $34,97 \pm 2,56$ %, respetivamente.

Pela análise da Figura 46 D, pode-se verificar que o extrato de *U. pinnatifida* apresenta baixa capacidade de sequestro do radical O₂^{•-}, uma vez que o máximo sequestro deste radical é de $34,4 \pm 0,11$ % para uma concentração de 2,0 mg/mL de extrato. Como não foi possível atingir o valor de IC₅₀ com a gama de concentrações de extrato testadas, e o controlo positivo utilizado neste estudo, o ácido ascórbico tem um IC₅₀ de 160,04 µg/mL (Soares et al., 2021), indica que o extrato é um fraco antioxidante no que respeita ao sequestro do radical O₂^{•-}.

Segundo Patra et al., 2017, um extrato de *U. pinnatifida* obtido através de uma MAE com água apresentou um IC₅₀ de 0,26089 mg/mL no sequestro do radical O₂^{•-}, mostrando que tem um poder antioxidante mais forte do que o do extrato produzido neste trabalho, mais uma vez devido ao facto da extração MAE com água possibilitar a extração de compostos hidrossolúveis em maiores quantidades, como é o caso dos antioxidantes. Apenas a partir da utilização de uma concentração de extrato de 0,50 mg/mL é que se verificou a existência de sequestro deste radical, e a percentagem de sequestro máxima obtida foi apenas 34,4 ± 0,11 % para uma concentração de extrato de 2,0 mg/mL. Ou seja, segundo a literatura, o IC₅₀ em relação ao sequestro do radical O₂^{•-} foi obtido para uma concentração de extrato de *U. pinnatifida* de cerca de 10 vezes inferior à concentração máxima de extrato utilizada neste trabalho. Outras algas marinhas, tais como *Sargassum serratifolium* que segundo Lim et al., 2019 pode apresentar um IC₅₀ de 0,0711 ± 0,61 mg/mL no sequestro do radical O₂^{•-}, apresentam uma atividade antioxidante mais elevada do que a *U. pinnatifida*, tanto a nível do descrito na literatura como no que foi obtido neste trabalho.

Por fim pela análise da Figura 46 E, é possível verificar que à semelhança dos resultados relativos ao sequestro de O₂^{•-}, o sequestro do radical [•]OH pelo extrato de *U. pinnatifida* também não atingiu o IC₅₀. O sequestro máximo do radical [•]OH atingido para a concentração de 4,0 mg/mL foi de 39,2 ± 0,95 %. Estes resultados mostram também que em relação ao sequestro de radicais livres como o [•]OH, o extrato de *U. pinnatifida* apresenta baixa capacidade antioxidante. O controlo positivo utilizado foi ácido ascórbico com um IC₅₀ de 183 µg/mL.

De acordo com a literatura, Cho, 2017 relata que um extrato de *U. pinnatifida* pode apresentar um sequestro do radical [•]OH de 33,53 ± 1,32 % para uma concentração de extrato de 8,0 mg/mL. Este valor em comparação com o sequestro obtido pelo extrato de *U. pinnatifida* deste trabalho, indica que apresenta maior atividade antioxidante em comparação com a literatura. No entanto, em ambos os casos, não foi atingido o IC₅₀ o que pode significar que os extratos de *U. pinnatifida* apresentam fraca atividade antioxidante no sequestro do radical [•]OH. Em relação a outras algas, a *S. fusiforme*, em comparação com a *U. pinnatifida*, *E. linza* e *P. tenera* é a que apresenta maior capacidade de sequestro deste radical, obtendo-se percentagens de sequestro de 65,87 ± 2,25 % para uma concentração de extrato de 8,0 mg/mL. Para as restantes algas e para a mesma concentração de extrato foram descritas percentagens de sequestro de 19,68 ± 1,78 e 35,42 ± 2,20 %, respetivamente, para as algas *E. linza* e *P. tenera*.

De um modo geral, a avaliação da atividade antioxidante do extrato de *U. pinnatifida* permitiu constatar que segundo as metodologias de sequestro de radicais como o DPPH[•] e ABTS^{•+}, o mesmo pode apresentar moderada atividade antioxidante. No entanto, quando se analisou de uma forma específica o sequestro dos radicais mais comuns presentes no sistema biológico, ou seja, as RNS ([•]NO) e ROS (O₂^{•-} e [•]OH) verificou-se que o extrato poderia apresentar apenas moderada atividade antioxidante em relação ao sequestro do [•]NO. Em relação às restantes ROS avaliadas apresentou baixa atividade antioxidante não chegando a atingir o IC₅₀ para as concentrações máximas testadas (2 mg/mL).

4.4. Ensaio *in vitro*: Avaliação da Atividade Enzimática do extrato de *U. pinnatifida*

A avaliação da atividade inibitória das enzimas AChE, BuChE e tirosinase pela ação do extrato de *U. pinnatifida*, tal como a avaliação da atividade antioxidante, foi também uma etapa importante para determinar se o extrato poderia apresentar benefícios no tratamento e prevenção das doenças neurodegenerativas, como a DA e DP.

A avaliação da atividade inibitória do extrato em relação às enzimas AChE e BuChE permitiu verificar se o extrato poderia ser utilizado para o tratamento e prevenção da DA, na medida em que a inibição destas enzimas permite a manutenção dos níveis de ACh, o principal neurotransmissor envolvido na DA (Araújo et al., 2016; Hannan et al., 2020; Petronilho et al., 2011).

Por outro lado, a avaliação da atividade inibitória em relação à enzima tirosinase, permitiu verificar se o extrato poderia ser utilizado para o tratamento e prevenção da DP, dado que a inibição desta enzima permite a manutenção dos níveis de dopamina, o principal neurotransmissor envolvido na DP (Beltrán Molina, 2017; Canto, 2014; Estevinho & Soares Fortunato, 2003; Niyonambaza et al., 2019).

Os resultados relativos à avaliação da atividade inibitória do extrato de *U. pinnatifida* em relação às enzimas AChE, BuChE e tirosinase estão representados na Figura 47 (A, B e C, respetivamente), em termos da curva dose-resposta.

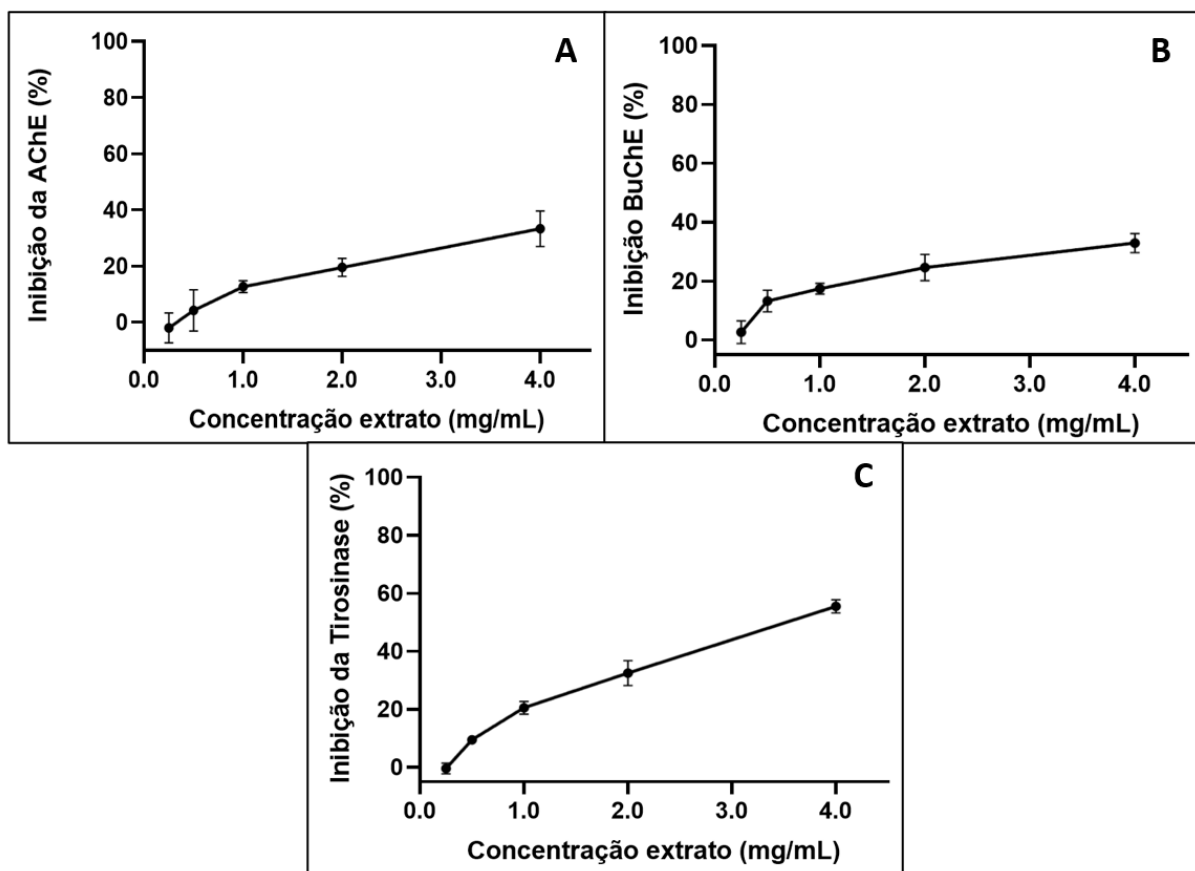


Figura 47. Inibição das enzimas AChE, BuChE e tirosinase em função das concentrações do extrato de *U. pinnatifida*.

Pela análise da representação gráfica da Figura 47 A é possível verificar que nas concentrações mais baixas (0,0625 e 0,125 mg/mL) o extrato não apresentou inibição da AChE. Apenas a partir da concentração de 0,50 mg/mL foi possível a obtenção da inibição mínima da AChE, que foi aumentando com o aumento da concentração de extrato até a um valor máximo de $33,3 \pm 6,3$ % para uma concentração de extrato de 4,0 mg/mL. A galantamina foi usada como o controlo positivo na avaliação da atividade inibitória da AChE, com um IC_{50} de 0,92 μ g/mL (Soares et al., 2021).

Assim sendo, como se pode constatar, não foi possível atingir o valor de IC_{50} para o intervalo de concentrações de extrato utilizadas. Isto significa que o extrato de *U. pinnatifida* apresenta baixa

atividade inibitória da AChE, e por isso quando utilizado na máxima concentração avaliada (4,0 mg/mL) não se destaca como um inibidor favorável ao tratamento e prevenção da DA. O extrato de *U. pinnatifida* apenas poderia ser considerado um bom inibidor da AChE caso apresentasse um IC₅₀ na mesma ordem de grandeza do controlo positivo galantamina (µg/mL).

Lourenço-Lopes et al., 2022, avaliaram um extrato de *U. pinnatifida* em acetona, num intervalo de concentrações de 1,0-2,0 mg/mL e observaram uma inibição de 25,27 % da enzima AChE, não atingindo também neste caso o IC₅₀. Para a mesma concentração de extrato de 2,0 mg/mL a inibição da AChE é maior comparativamente à que é obtida a partir do extrato utilizado neste trabalho (19,52 ± 5,6 %) (Lourenço-Lopes et al., 2022). No entanto, em ambos os casos o extrato de *U. pinnatifida* apresenta fraca atividade neuroprotetora na inibição da AChE. Segundo, Choi et al., 2015, a alga marinha *E. bicyclis* apresenta uma forte atividade inibitória da AChE em comparação com a *U. pinnatifida*, uma vez que para uma concentração de extrato etanólico de 0,025 mg/mL tem a capacidade de inibir 68,01 ± 1,37 %.

Pela observação da representação gráfica da Figura 47 B é possível comprovar que o extrato da *U. pinnatifida* também apresentou baixas inibições da BuChE, obtendo-se a inibição mínima para uma concentração de 0,250 mg/mL, a partir da qual foi aumentando com o aumento da concentração de extrato, atingindo uma inibição máxima de 33,0 ± 3,3 % para a máxima concentração avaliada de 4,0 mg/mL. Também no caso da avaliação da atividade inibitória da BuChE, foi utilizada a galantamina como controlo positivo com um IC₅₀ de 4,92 µg/mL (Soares et al., 2021).

Lourenço-Lopes et al., 2022, usaram um extrato de *U. pinnatifida*, extraído com acetona, no intervalo de concentrações de 1,0-2,0 mg/mL apresentando uma inibição de 37,70 % da enzima BuChE, não sendo atingido o IC₅₀. Para a mesma concentração de extrato de 2,0 mg/mL a inibição da BuChE é maior comparativamente à que é obtida a partir do extrato utilizado neste trabalho (25,61 ± 7,7 %) (Lourenço-Lopes et al., 2022). No entanto, em ambos os casos o extrato de *U. pinnatifida* apresenta fraca atividade neuroprotetora na inibição da BuChE. Mais uma vez, segundo Choi et al., 2015, a alga marinha *E. bicyclis* apresenta uma forte atividade inibitória da BuChE em comparação com a *U. pinnatifida*, dado que para uma concentração de extrato etanólico de 0,025 mg/mL obteve-se uma inibição de 95,72 ± 3,80 % da BuChE. Estes dados significam que o extrato de *U. pinnatifida* é um inibidor fraco de BuChE, em comparação com outras algas.

Os resultados relativos à avaliação da atividade inibitória do extrato de *U. pinnatifida* em relação à enzima tirosinase estão representados na Figura 47 C, e permitem verificar que para a enzima tirosinase, o extrato de *U. pinnatifida* apresenta maior capacidade de inibição da atividade da mesma, ao contrário do que ocorreu a nível da AChE e BuChE. A concentração mínima de extrato utilizado para o qual começou a existir inibição da tirosinase foi 0,50 mg/mL, a partir do qual a inibição foi aumentando até à concentração de 4,0 mg/mL, atingindo uma inibição máxima de 55,5 ± 2,3 %. Este resultado significa que o extrato de *U. pinnatifida* apresentou capacidade de inibir 55,5 ± 2,3 % da concentração da enzima tirosinase, sendo que o IC₅₀ foi atingido a uma concentração de extrato de *U. pinnatifida* de 3,52 mg/mL. O ácido kojic foi usado como o controlo positivo na avaliação da atividade inibitória da tirosinase, com um IC₅₀ de 1,82 µg/mL (Soares et al., 2021), assim sendo, pode-se considerar que o extrato de *U. pinnatifida* é apenas um inibidor moderado da tirosinase uma vez que em comparação com o controlo positivo é necessária uma concentração de extrato numa ordem de grandeza maior (mg/mL) para inibir 50 % da enzima.

Na literatura, segundo Zeng et al., 2022, é possível verificar que um extrato de *U. pinnatifida* pode apresentar uma inibição de 41,06 % em relação à tirosinase a uma concentração de extrato de 2,5 mg/mL. Segundo estes autores não foi possível atingir o IC₅₀. Comparando com outras algas marinhas,

tais como a *Ecklonia stolonifera*, a *U. pinnatifida* apresenta uma fraca capacidade na inibição da tirosinase, uma vez que esta alga apresenta um IC_{50} a uma concentração de 0,354 mg/mL, ou seja, o extrato metanólico desta alga possibilita a inibição de 50 % da concentração da tirosinase a uma concentração cerca de 10 vezes inferior à necessária quando se utiliza o extrato de *U. pinnatifida* preparado neste trabalho.

Estes resultados indicam que o extrato de *U. pinnatifida* pode apresentar efeitos benéficos no tratamento e prevenção da DP, na medida em que possibilita uma inibição moderada da tirosinase em pelo menos 50 % da sua atividade, enzima esta que é responsável pela degradação da dopamina, o principal neurotransmissor envolvido na DP. No entanto, de uma forma geral a nível da inibição enzimática comparativamente com outras algas marinhas, a *U. pinnatifida* poderá não ser a mais adequada para o tratamento da DA e DP a nível da inibição das enzimas AChE, BuChE e tirosinase. Isto porque extratos de acetona e metanol de algas como a *E. bicyclis* e *E. stolonifera*, respetivamente, apresentaram uma forte capacidade na inibição destas enzimas a concentrações de extrato baixas relativamente às necessárias para a *U. pinnatifida*, apesar dos extratos com acetona apresentarem inibições relativamente melhores.

4.5. Ensaios *in vivo*: Avaliação do desenvolvimento do peixe-zebra pela ação do extrato de *U. pinnatifida*

De acordo com a metodologia mencionada anteriormente, foram recolhidos e analisados os possíveis efeitos do extrato de *U. pinnatifida* obtido a partir da MAE com água: etanol (50:50, v/v) numa razão sólido: solvente de 1:40 g:mL, a 40 °C durante 30 minutos, para diferentes concentrações do mesmo. Foram analisadas a ocorrência de malformações nos embriões ou larvas do peixe-zebra expostos ao extrato e possíveis efeitos do extrato no comprimento total das larvas de peixe-zebra eclodidas.

Na Figura 48 estão representados os resultados relativos à mortalidade acumulada (A), à deformação do saco vitelino (B), às malformações dos olhos (D), às anomalias na circulação sanguínea €, às anomalias na pigmentação (F), às deformações esqueléticas (G) e à posição lateral das larvas (H), num período de observação de 96 hpf, e os resultados relativos ao destacamento da cauda dos embriões observado às 48 hpf (C). Para além disso, para cada tipo de anomalia ou deformação analisada, estão também apresentados os respetivos resultados obtidos para o controlo negativo e para o controlo de solvente.

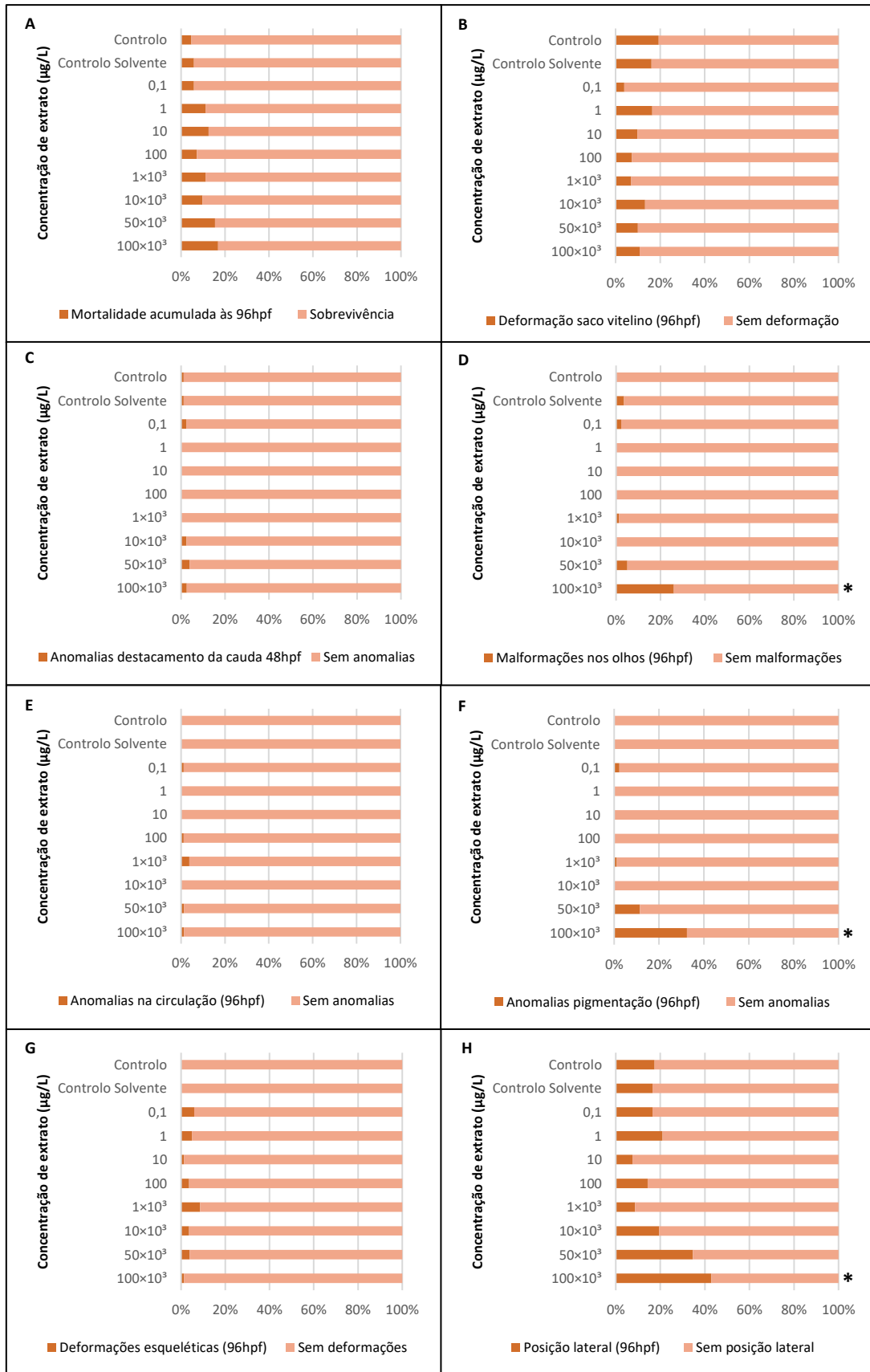


Figura 48. Frequência acumulada de malformações observadas no controlo negativo, controlo com solvente e nos embriões/larvas expostos a diferentes concentrações do extrato de *U. pinnatifida* testado às 48 e 96 hpf. Legenda: O símbolo * - indica que existem diferenças estatísticas ($p < 0.05$) em relação ao controlo solvente.

Pela análise das Figura 48 A-C, E, G, foi possível verificar que não existiram aumentos significativos em relação ao grupo de controlo com solvente para a mortalidade acumulada às 96 hpf (A), deformação do saco vitelino às 96 hpf (B), anomalias no destacamento da cauda às 48 hpf (C), anomalias na circulação sanguínea às 96 hpf (E) e para as deformações esqueléticas às 96 hpf (G). Por outro lado, pela observação da Figura 48 D, F e H foi possível verificar que existiram aumentos significativos ($p\text{ value} < 0,05$) em relação ao grupo de controlo com solvente para as malformações dos olhos às 96 hpf, anomalias na pigmentação às 96 hpf e para a posição lateral das larvas às 96 hpf.

Para além das anomalias ou deformações possíveis de observar pela ação do extrato de *U. pinnatifida*, como referido na metodologia, foram também analisadas as taxas de eclosão dos embriões às 48, 72 e 96 hpf e o comprimento total das larvas às 96 hpf. Os resultados obtidos relativamente à taxa de eclosão estão apresentados na Figura 49.

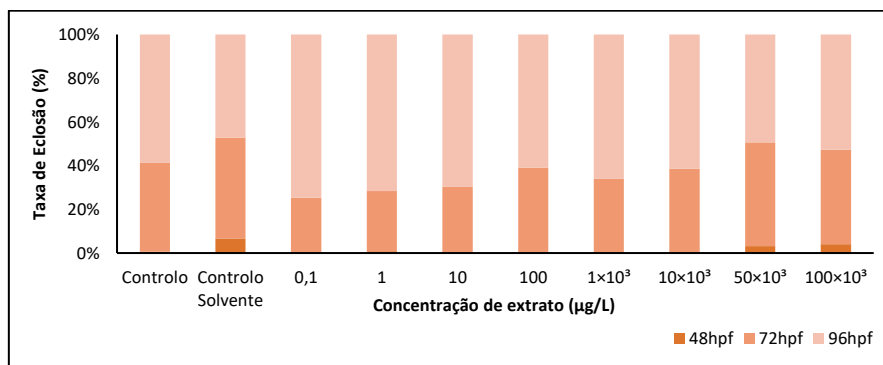


Figura 49. Taxa de eclosão (%) dos embriões de peixe-zebra avaliada às 48, 72 e 96 hpf, para os controlos (negativo e com solvente) e para as concentrações de extrato de *U. pinnatifida* utilizadas

Através da observação das taxas de eclosão apresentadas na Figura 49, foi possível verificar que a taxa de eclosão a nível das concentrações de extrato de *U. pinnatifida* utilizadas ocorreu maioritariamente às 72 e às 96 hpf, e por comparação relativamente aos controlos (negativo e com solvente), observou-se que não existiram diferenças significativas nas taxas de eclosão dos embriões do peixe-zebra. Isto pode significar que as concentrações de extrato utilizadas não tiveram influência na eclosão dos embriões do peixe-zebra.

Por fim, os resultados obtidos para o comprimento total das larvas do peixe-zebra estão representados na Figura 50.

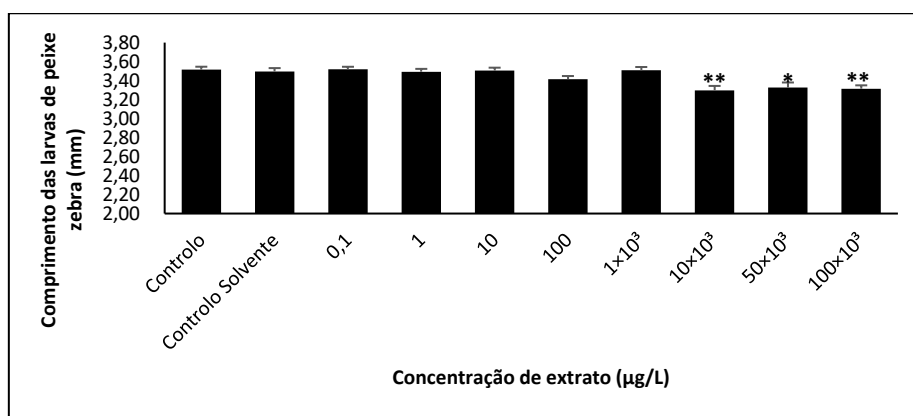


Figura 50. Comprimento total das larvas de peixe-zebra expostas durante 96 hpf às diferentes concentrações do extrato de *U. pinnatifida* (0,1; 1; 10; 100; 1×10³; 10×10³; 50×10³ e 100×10³µg/L), e o comprimento total das larvas do controlo negativo e do controlo com solvente. Legenda: *diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo com solvente a $p < 0,05$; **diferenças estatisticamente significativas relativamente ao controlo com solvente a $p < 0,01$.

Pela observação dos resultados apresentados na Figura 50, foi possível verificar que o comprimento total médio das larvas do peixe-zebra, às 96 hpf, para o controlo negativo e para o controlo com solvente foi de $3,51 \pm 0,03$ mm e $3,50 \pm 0,04$ mm, respetivamente.

Para as concentrações mais baixas estudadas do extrato de *U. pinnatifida* (0,1- 100 $\mu\text{g/L}$) não existiram diferenças significativas no comprimento total das larvas do peixe-zebra em comparação com o comprimento total das larvas do peixe-zebra do controlo com solvente, pelo que assim é possível referir que a exposição a um extrato de *U. pinnatifida* com estas concentrações não afetou o comprimento total das larvas expostas.

Por outro lado, as larvas expostas às concentrações mais elevadas de extrato tais como 10×10^3 , 50×10^3 e 100×10^3 $\mu\text{g/L}$, apresentaram efeitos significativos no comprimento total das larvas expostas (*p value* <0,001), uma vez que se observou uma pequena, mas consistente diminuição do comprimento total das larvas eclodidas ($3,30 \pm 0,05$ (*p value* < 0,01), $3,33 \pm 0,05$ (*p value* < 0,05) e $3,31 \pm 0,04$ mm (*p value* < 0,01), respetivamente). Em termos de percentagens, o comprimento médio total das larvas do peixe-zebra apresentou uma diminuição de 6,2 %, 5,4 % e 5,7 % para as concentrações de 10×10^3 , 50×10^3 e 100×10^3 $\mu\text{g/L}$, respetivamente, em comparação com o controlo com solvente. Estes resultados podem significar que a exposição dos embriões do peixe-zebra a concentrações mais elevadas do extrato de *U. pinnatifida*, como 10×10^3 , 50×10^3 e 100×10^3 $\mu\text{g/L}$ (0,010, 0,050 e 0,10 mg/mL) têm efeitos de diminuição do comprimento total das larvas eclodidas.

Segundo, Silva et al., 2022, fucoidanos extraídos da *U. pinnatifida* não apresentam toxicidade no desenvolvimento do peixe-zebra, sendo que até pode ser benéfico a nível do stress oxidativo pois apresenta forte atividade no sequestro do radical $\cdot\text{OH}$ atenuando a morte causada no peixe-zebra. Não foram encontrados estudos em peixe zebra com outros compostos bioativos de algas.

Cruzando os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* (avaliação da atividade antioxidante e inibitória de enzimas) com os resultados obtidos nos ensaios *in vivo*, pode-se verificar que para as concentrações de extrato que causam efeitos negativos significativos no desenvolvimento do peixe-zebra (0,010, 0,050 e 0,10 mg/mL) são menores do que as necessárias para a obtenção do IC_{50} nos ensaios *in vitro* realizados a nível da avaliação da atividade antioxidante, como é o caso do sequestro DPPH \cdot ($\text{IC}_{50} = 2,25$ mg/mL), ABTS $^{+\cdot}$ ($\text{IC}_{50} = 2,30$ mg/mL) e $\cdot\text{NO}$ ($\text{IC}_{50} = 1,19$ mg/mL), e a nível da atividade inibitória das enzimas tais como a tirosinase ($\text{IC}_{50} = 3,52$ mg/mL). Estes resultados podem significar que caso fosse realizada a avaliação da bioatividade neuroprotetora dos extratos de *U. pinnatifida* nos peixe-zebra, o desenvolvimento deles seria afetado, ou seja, haveria toxicidade, uma vez que para a existência de bioatividade (IC_{50}) teriam de ser usadas concentrações mais elevadas às que provaram causar toxicidade nos peixe-zebra. No entanto, estes resultados podem servir apenas como uma previsão sobre possíveis efeitos tóxicos nos peixe-zebra, na medida em que não se pode afirmar que as concentrações de extrato relativas a estes IC_{50} apresentam toxicidade no peixe-zebra sem que sejam testadas estas bioatividades *in vivo*.

Mattes, 2020 refere que os resultados *in vitro* podem ser usados como forma preditiva dos resultados *in vivo*, no entanto quando estes são realizados, podem não ser concordantes com os previstos pelos testes *in vitro*. De forma a avaliar se os testes clínicos posteriores (*in vivo*) foram previstos pelos testes pré-clínicos (*in vitro*), Steger-Hartmann & Raschke, 2020 investigaram 4000 aprovações de medicamentos realizados pela Food and Drug Administration (FDA) e pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA), para estudos respiratórios pré-clínicos realizados de acordo com o descrito no Conselho Internacional para a Harmonização (ICH), e constataram que nessas aprovações existiu pouca ou nenhuma concordância com o resultado clínico posterior.

Para além disso, caso fosse realizada a análise da bioatividade do extrato de *U. pinnatifida*, no peixe-zebra, as enzimas seriam diferentes das utilizadas nos testes *in vitro*, na medida em que seriam utilizadas enzimas AChE, BuChE e tirosinase extraídas do peixe-zebra, enquanto nos ensaios *in vitro*, estas enzimas foram extraídas, respetivamente de enguias, soro de cavalo e cogumelo. Ou seja, a utilização de enzimas extraídas de diferentes organismos em testes *in vitro* e *in vivo* pode também indicar que os resultados *in vivo* em termos de IC_{50} , quando testados, poderão não ser concordantes com os resultados *in vitro*.

Capítulo 5 – Conclusões

A realização deste trabalho permitiu estudar a influência de vários parâmetros de extração para a obtenção de um extrato rico em compostos fenólicos, carotenoides e clorofilas. Este extrato foi, de seguida, caracterizado do ponto de vista biológico, através de vários ensaios *in vitro* e *in vivo*.

Em relação às metodologias de extração utilizadas para a obtenção de um extrato de *U. pinnatifida*, foi possível concluir que a MAE é a metodologia de extração com maior eficiência e rapidez na sua realização quando comparada com as extrações convencionais executadas, na medida em que permite a obtenção de rendimentos de cerca de 30 % superiores aos obtidos numa extração convencional, num menor tempo. Para além disso, foi também possível concluir que a otimização da MAE foi conseguida para as condições de extração com a mistura de solventes água: acetona (10:90) e água: etanol (50:50 v/v) a 40 °C durante 30 min e numa razão de sólido: solvente de 1:40 g:mL. No entanto como se verificou que o extrato de água: acetona (10:90) conduzia a grandes dificuldades de dissolução em todos os solventes necessários para a avaliação de atividade antioxidante (exceto para o TPC e o conteúdo de carotenoides e clorofilas em que o solvente utilizado foi o metanol) e avaliação da atividade enzimática, o mesmo foi excluído das restantes análises realizadas *in vitro* e *in vivo*.

Quanto à avaliação da atividade antioxidante do extrato de *U. pinnatifida* obtido pela MAE com água: etanol (50:50 v/v) nas condições descritas acima, foi possível concluir que segundo as metodologias de sequestro de radicais como o DPPH[•] e ABTS^{•+}, o mesmo pode apresentar moderada atividade antioxidante no sequestro destes radicais, uma vez que o IC₅₀ foi obtido para uma concentração de extrato na ordem de grandeza dos mg/mL, uma ordem de grandeza superior à obtida nos controlos positivos (µg/mL) considerados fortes antioxidantes. No entanto, quando se analisou de uma forma específica o sequestro dos radicais mais comuns presentes no sistema biológico, ou seja, as RNS (•NO) e ROS (O₂^{•-} e •OH) verificou-se que o extrato poderia apresentar moderada atividade antioxidante em relação ao sequestro do •NO, no qual foi atingido o IC₅₀ para uma concentração de 1,19 mg/mL, ou seja, de uma ordem de grandeza superior à do controlo positivo (µg/mL). Em relação às restantes ROS avaliadas, apresentou baixa atividade antioxidante não chegando a atingir o IC₅₀ nas concentrações utilizadas (mg/mL). Resumidamente, o extrato de *U. pinnatifida* apresenta uma atividade antioxidante moderada no caso do sequestro dos radicais DPPH[•], ABTS^{•+} e •NO.

De uma forma geral, a *U. pinnatifida* em comparação com outras algas marinhas mencionadas na literatura, é a que apresenta menor capacidade antioxidante, sendo que *S. palidum*, *S. serratifolium* e *S. fusiforme* as mais promissoras no sequestro dos radicais DPPH[•], •NO, O₂^{•-} e •OH.

Em relação à inibição da atividade das enzimas do SNC foi possível concluir que o extrato de *U. pinnatifida* apresentou baixa capacidade de inibição das enzimas AChE e BuChE, nas quais não foi possível o cálculo do IC₅₀, uma vez que as percentagens máximas de inibição obtidas apresentaram respetivamente os valores de 33,3 ± 6,3 % e 33,0 ± 3,3 %, para concentrações de extrato de 4,0 mg/mL. Por outro lado, em relação à enzima tirosinase, foi possível concluir que o extrato de *U. pinnatifida* apresentou uma moderada atividade uma vez que neste caso foi possível o cálculo do IC₅₀ obtido para a concentração de extrato de 3,52 mg/mL. O extrato de *U. pinnatifida* apenas poderia ser considerado um bom inibidor destas enzimas caso apresentasse um IC₅₀ na mesma ordem de grandeza da observada nos controlos positivos utilizados (µg/mL), no entanto como o IC₅₀ apresentado se encontra na ordem de grandeza, mg/mL, então é considerado um inibidor moderado.

No entanto, de uma forma geral a nível da inibição enzimática comparativamente a outras algas marinhas, a *U. pinnatifida* apresenta menor capacidade a nível da inibição das enzimas AChE, BuChE

e tirosinase. Isto porque algas como a *E. bicyclis* (inibição AChE: 0,025 mg/mL – 68,01 ± 1,37 %, inibição BuChE: 0,025 mg/mL – 95,72 ± 3,80 %) e *E. stolonifera* (inibição tirosinase: IC₅₀ – 0,354 mg/mL) em extratos de acetona e metanol, respetivamente, apresentaram uma forte capacidade na inibição destas enzimas a concentrações de extrato baixas relativamente às necessárias para a *U. pinnatifida*.

Por fim, em termos dos ensaios *in vivo* em relação à avaliação do desenvolvimento do peixe-zebra exposto ao extrato de *U. pinnatifida* obtido pela extração MAE com o solvente água: etanol (50:50, v/v), foi possível concluir que o mesmo não apresentou efeitos negativos significativos nas taxas de eclosão dos embriões expostos, no entanto para os mesmos, o comprimento total das larvas eclodidas apresentaram diminuições com valores significativos para as concentrações de extrato mais altas 10×10³ (6,2 %), 50×10³ (5,4 %) e 100×10³ (5,7 %) µg/L. Para além disso, a concentração de extrato mais alta (100×10³ µg/L) foi também responsável pelo aparecimento significativo de malformações a nível dos olhos, pigmentação e a nível da posição lateral da larva às 96 hpf. É de realçar que estas anomalias ou malformações apenas ocorrem de forma significativa a concentrações de extrato consideradas muito elevadas pelo que a nível ambiental é improvável a presença das mesmas, no entanto o estudo com estas concentrações serviu como um teste laboratorial para a determinação de um intervalo de concentrações de exposição com e sem efeitos significativos no desenvolvimento embrionário do peixe-zebra (sem efeitos negativos significativos - 0,1 a 1×10³ µg/L; com efeitos negativos significativos - 10×10³, 50×10³ e 100×10³ µg/L).

Cruzando os resultados obtidos nos ensaios *in vitro* com os resultados obtidos nos ensaios *in vivo*, pode-se concluir que para as concentrações de extrato que causam efeitos negativos significativos no desenvolvimento do peixe-zebra (0,010, 0,050 e 0,10 mg/mL) são menores do que as necessárias para a obtenção do IC₅₀ nos ensaios *in vitro* realizados, como é o caso do sequestro do DPPH* (IC₅₀ = 2,25 mg/mL), ABTS⁺ (IC₅₀ = 2,30 mg/mL) e *NO (IC₅₀ = 1,19 mg/mL), e a nível da atividade inibitória da tirosinase (IC₅₀ = 3,52 mg/mL), o que pode prever que caso fosse realizada a avaliação da bioatividade neuroprotetora dos extratos de *U. pinnatifida* nos peixe-zebra poderia haver toxicidade. No entanto, como nos ensaios *in vitro* foram utilizadas enzimas AChE, BuChE e tirosinase, respetivamente, extraídas de enguias, soro de cavalo e cogumelo, e nos ensaios *in vivo*, caso fossem realizados, seriam utilizadas as enzimas do peixe-zebra, os resultados em termos de IC₅₀ poderiam não ser concordantes com os obtidos nos ensaios *in vitro*, e, caso os valores de IC₅₀ fossem mais baixos, o extrato de *U. pinnatifida* poderia não apresentar toxicidade nessas concentrações.

Como perspetivas futuras, seria interessante testar a atividade inibitória dos extratos de *U. pinnatifida* para as enzimas MAO-A e MAO-B, envolvidas na patogénese de doenças neuropsiquiátricas como a depressão. Para além disso, seria também interessante avaliar *in vivo* nos peixe-zebra a atividade neuroprotetora dos extratos para além dos ensaios de desenvolvimento realizados, atividade esta que também não foi possível realizar neste trabalho. Como forma de serem obtidas melhores atividades neuroprotetoras do que as obtidas *in vitro* neste trabalho, poderiam ser testadas outras espécies de algas como *S. palidum*, *S. serratifolium*, *S. fusiforme*, *E. bicyclis* ou *E. stolonifera* bem como diferentes condições e métodos de extração.

Referências Bibliográficas

- Abreu, M. S., Friend, A. J., Demin, K. A., Amstislavskaya, T. G., Bao, W., & Kalueff, A. v. (2018). Zebrafish models: do we have valid paradigms for depression? *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, *94*, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2018.07.002>
- Aljanabi, R., Alsous, L., Sabbah, D. A., Gul, H. I., Gul, M., & Bardaweel, S. K. (2021). Monoamine oxidase (MAO) as a potential target for anticancer drug design and development. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 19). MDPI. <https://doi.org/10.3390/molecules26196019>
- Alzheimer Portugal. (2022a). *Inibidores da Colinesterase*. <https://alzheimerportugal.org/inibidores-da-colinesterase/>
- Alzheimer Portugal. (2022b). *Memantina*. <https://alzheimerportugal.org/memantina/>
- Apak, R., Gorinstein, S., Böhm, V., Schaich, K. M., Özyürek, M., & Güçlü, K. (2013). Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, *85*(5), 957–998. <https://doi.org/10.1351/PAC-REP-12-07-15>
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016a). Antioxidant activity/capacity measurement. 1. Classification, physicochemical principles, mechanisms, and electron transfer (ET)-based assays. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 64, Issue 5, pp. 997–1027). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04739>
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016b). Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 64, Issue 5, pp. 1028–1045). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04743>
- Apak, R., Özyürek, M., Güçlü, K., & Çapanoğlu, E. (2016c). Antioxidant activity/capacity measurement. 3. Reactive oxygen and nitrogen species (ROS/RNS) scavenging assays, oxidative stress biomarkers, and chromatographic/chemometric assays. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry* (Vol. 64, Issue 5, pp. 1046–1070). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04744>
- Araújo, C. R. M., Santos, V. L. A., & Gonsalves, A. A. (2016). Acetylcholinesterase - AChE: A pharmacological interesting enzyme. *Revista Virtual de Quimica*, *8*(6), 1818–1834. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160122>
- Bajpai, A., Verma, A. K., Srivastava, M., & Srivastava, R. (2014). Oxidative stress and major depression. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, *8*(12), CC04–CC07. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/10258.5292>
- Barbalace, M. C., Malaguti, M., Giusti, L., Lucacchini, A., Hrelia, S., & Angeloni, C. (2019a). Anti-inflammatory activities of marine algae in neurodegenerative diseases. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 20, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms20123061>
- Barbalace, M. C., Malaguti, M., Giusti, L., Lucacchini, A., Hrelia, S., & Angeloni, C. (2019b). Anti-inflammatory activities of marine algae in neurodegenerative diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(12). <https://doi.org/10.3390/ijms20123061>

- Barbosa, E. F., Borges, L. L., Lúcio, T. C., & Gil, E. S. (2011). *Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais*. <https://www.researchgate.net/publication/329220903>
- Beltrán Molina, E. M. (2017). Neurotransmitters, Their Effects on the Human Organism. *Anatomy Physiology & Biochemistry International Journal*, 2(2). <https://doi.org/10.19080/apbij.2017.02.555581>
- Berger, M., Gray, J. A., & Roth, B. L. (2009). The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine*, 60, 355–366. <https://doi.org/10.1146/annurev.med.60.042307.110802>
- Bhatt, S., Nagappa, A. N., & Patil, C. R. (2020, July 1). Role of oxidative stress in depression. *Drug Discovery Today*, 25(7), 1270–1276. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2020.05.001>
- Canto, V. P. (2014). *Estudo computacional das monoaminoxidases A e B com substratos inibidores*.
- Carreira, B. P. (2014). *Regulação da neurogênese pelo óxido nítrico - Artigo de Revisão*.
- Caruso, G., Benatti, C., Blom, J. M. C., Caraci, F., & Tascetta, F. (2019). The many faces of mitochondrial dysfunction in depression: From pathology to treatment. *Frontiers in Pharmacology*, 10(SEP). <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00995>
- Cavaillon, J.-M. (2001). *Pro- versus anti-inflammatory cytokines: Myth or reality*. <https://www.researchgate.net/publication/11843030>
- Cho, K.-S. (2017). ABTS+ Radical, Hydroxy Radical (OH), Nitric Oxide (NO), and Ferric Ion Reducing Antioxidant Power (FRAP) Effects of Ethanol Extracts from Four Seaweed Species for Noodles. *Journal of Life Science*, 27(10), 1121–1129. <https://doi.org/10.5352/JLS.2017.27.10.1121>
- Choi, J. S., Haulader, S., Karki, S., Jung, H. J., Kim, H. R., & Jung, H. A. (2015). Acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitory activities of the edible brown alga *Eisenia bicyclis*. *Archives of Pharmacal Research*, 38(8), 1477–1487. <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0515-1>
- CIIMAR. (2017). *Animais do CIIMAR: #1 – Peixe-zebra*. <https://ciimarnaescola.wordpress.com/2017/02/28/animais-do-ciimar-1-peixe-zebra/>
- Cruz, A. (2018). *A importância das macroalgas castanhas para o desenvolvimento de nutracêuticos*. [Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de Ciências da Saúde]. https://bdigital.ufp.pt/bitstream/10284/7370/1/TC_31416.pdf
- Delazar, A., Nahar, L., Hamedeyazdan, S., & Sarker, S. D. (2012). Microwave-assisted extraction in natural products isolation. *Methods in Molecular Biology*, 864, 89–115. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1_5
- Eisenhofer, G., Tian, H., Holmes, C., Matsunaga, J., Roffler-Tarlov, S., & Hearing, V. J. (2003). Tyrosinase: a developmentally specific major determinant of peripheral dopamine. *The FASEB Journal*, 17(10), 1248–1255. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0736com>
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7, 88–95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
- Esler, L. (2015). *Wakame (Undaria pinnatifida)*. <https://www.biodiversity4all.org/taxa/68786-Undaria-pinnatifida>

- Estevinho, M. F., & Soares Fortunato, J. (2003). Dopamina e Recetores. *Revista Portuguesa de Psicossomática, Volume 5*(nº1), 21–31.
- Evans, L. (2022). *UV-VIS Spectrophotometry A Brief Background to Spectrophotometry*. https://biochromspectros.com/media/wysiwyg/support_page/UV-Visible_Spectrophotometry.pdf
- Félix, R. (2017). *Processamento e caracterização de extratos fenólicos de macroalgas: uma abordagem sistemática*.
- Filho, H. B., Krug, F. J., Zagatto, E., & Rocha, F. (2010). *Espetrofotometria no ultravioleta e visível*.
- Filipe, R., & Gonçalves, G. (2012). *Colocasia esculenta (L.) Shott: perfil fenólico e bioatividade* [Tese de Mestrado]. Universidade de Aveiro.
- Fung, A., Hamid, N., & Lu, J. (2013, January 15). Fucoxanthin content and antioxidant properties of *Undaria pinnatifida*. *Food Chemistry, 136*(2), 1055–1062. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.024>
- Garcia-Perez, P., Lourenço-Lopes, C., Silva, A., Pereira, A. G., Fraga-Corral, M., Zhao, C., Xiao, J., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2022). Pigment Composition of Nine Brown Algae from the Iberian Northwestern Coastline: Influence of the Extraction Solvent. *Marine Drugs, 20*(2). <https://doi.org/10.3390/md20020113>
- Ghasemi, M., & Fatemi, A. (2014). Pathologic role of glial nitric oxide in adult and pediatric neuroinflammatory diseases. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews, 45*, 168–182. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2014.06.002>
- Gonçalves, B. F., & Pedro, P. (2019). *Estudo das atividades biológicas da alga Undaria pinnatifida Dissertação orientada por: Professora Doutora Maria Luísa Mourato Oliveira Marques Serralheiro*.
- Gordalina, M., Pinheiro, H. M., Mateus, M., da Fonseca, M. M. R., & Cesário, M. T. (2021). Macroalgae as protein sources—a review on protein bioactivity, extraction, purification and characterization. In *Applied Sciences (Switzerland)* (Vol. 11, Issue 17). MDPI. <https://doi.org/10.3390/app11177969>
- Götz, J., Bodea, L. G., & Goedert, M. (2018). Rodent models for Alzheimer disease. *Nature Reviews Neuroscience, 19*(10), 583–598. <https://doi.org/10.1038/s41583-018-0054-8>
- Grosso, C., Valentão, P., Ferreres, F., & Andrade, P. B. (2015). Alternative and efficient extraction methods for marine-derived compounds. In *Marine Drugs* (Vol. 13, Issue 5, pp. 3182–3230). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/md13053182>
- Hannan, M. A., Dash, R., Haque, M. N., Mohibullah, M., Sohag, A. A. M., Rahman, M. A., Uddin, M. J., Alam, M., & Moon, I. S. (2020, July 1). Neuroprotective Potentials of Marine Algae and Their Bioactive Metabolites: Pharmacological Insights and Therapeutic Advances. *Marine Drugs, 18*(7). <https://doi.org/10.3390/md18070347>
- Huang, W. J., Zhang, X., & Chen, W. W. (2016). Role of oxidative stress in Alzheimer's disease (review). In *Biomedical Reports* (Vol. 4, Issue 5, pp. 519–522). Spandidos Publications. <https://doi.org/10.3892/br.2016.630>
- Ingkaninan, K., de Best, C. M., van der Heijden, R., Hofte, A. J. P., Karabatak, B., Irth, H., Tjaden, U. R., van der Greef, J., & Verpoorte, R. (2000). High-performance liquid chromatography with on-

- line coupled UV, mass spectrometric and biochemical detection for identification of acetylcholinesterase inhibitors from natural products. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 872). www.elsevier.com/locate/chroma
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., & Thongnoi, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*, 89(2–3), 261–264. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2003.08.008>
- Jung, H. A., Roy, A., & Choi, J. S. (2017). In vitro monoamine oxidase A and B inhibitory activity and molecular docking simulations of fucoxanthin. *Fisheries Science*, 83(1), 123–132. <https://doi.org/10.1007/s12562-016-1036-2>
- Khazdair, M. R., Anaeigoudari, A., Hashemzahi, M., & Mohebbati, R. (2019). Neuroprotective potency of some spice herbs, a literature review. In *Journal of Traditional and Complementary Medicine* (Vol. 9, Issue 2, pp. 98–105). National Taiwan University. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2018.01.002>
- Kimmel, C. B., Ballard, W. W., Kimmel, S. R., Ullmann, B., & Schilling, T. F. (1995). *Stages of Embryonic Development of the Zebrafish*.
- Koh, H. S. A., Lu, J., & Zhou, W. (2019). Structure characterization and antioxidant activity of fucoidan isolated from *Undaria pinnatifida* grown in New Zealand. *Carbohydrate Polymers*, 212, 178–185. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.040>
- Lim, S., Choi, A. H., Kwon, M., Joung, E. J., Shin, T., Lee, S. G., Kim, N. G., & Kim, H. R. (2019). Evaluation of antioxidant activities of various solvent extract from *Sargassum serratifolium* and its major antioxidant components. *Food Chemistry*, 278, 178–184. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.11.058>
- Lin, J., Huang, L., Yu, J., Xiang, S., Wang, J., Zhang, J., Yan, X., Cui, W., He, S., & Wang, Q. (2016). Fucoxanthin, a marine carotenoid, reverses scopolamine-induced cognitive impairments in mice and inhibits acetylcholinesterase in vitro. *Marine Drugs*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/md14040067>
- Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Soria-Lopez, A., Nuñez-Estevez, B., Barral-Martinez, M., Silva, A., Li, N., Liu, C., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2022a). Fucoxanthin's Optimization from *Undaria pinnatifida* Using Conventional Heat Extraction, Bioactivity Assays and In Silico Studies. *Antioxidants*, 11(7), 1296. <https://doi.org/10.3390/antiox11071296>
- Lourenço-Lopes, C., Fraga-Corral, M., Soria-Lopez, A., Nuñez-Estevez, B., Barral-Martinez, M., Silva, A., Li, N., Liu, C., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2022b). Fucoxanthin's Optimization from *Undaria pinnatifida* Using Conventional Heat Extraction, Bioactivity Assays and In Silico Studies. *Antioxidants*, 11(7), 1296. <https://doi.org/10.3390/antiox11071296>
- Lourenço-Lopes, C., Garcia-Oliveira, P., Carpena, M., Fraga-Corral, M., Jimenez-Lopez, C., Pereira, A. G., Prieto, M. A., & Simal-Gandara, J. (2020). Scientific approaches on extraction, purification and stability for the commercialization of fucoxanthin recovered from brown algae. In *Foods* (Vol. 9, Issue 8). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/foods9081113>
- Lovinger, D. M. (2008). Communication Networks in the Brain Neurons, Receptors, Neurotransmitters, and Alcohol. *Alcohol Research & Health*, Volume 31(3).

- Maria Streit, N., Pedrolo Canterle, L., Weber do Canto, M., & Helena Hychhecki Hecktheuer, L. (2005). As Clorofilas - Revisão Bibliográfica. *Ciência Rural*, 35(3), 748–755.
- Marxen, K., Vanselow, K. H., Lippemeier, S., Hintze, R., Ruser, A., & Hansen, U.-P. (2007). Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. *Sensors*, 7, 2080–2095. www.mdpi.org/sensors
- Masuda, T., Fujita, N., Odaka, Y., Takeda, Y., Yonemori, S., Nakamoto, K., & Kuninaga, H. (2007a). Tyrosinase inhibitory activity of ethanol extracts from medicinal and edible plants cultivated in Okinawa and identification of a water-soluble inhibitor from the leaves of *Nandina domestica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(9), 2316–2320. <https://doi.org/10.1271/bbb.70249>
- Masuda, T., Fujita, N., Odaka, Y., Takeda, Y., Yonemori, S., Nakamoto, K., & Kuninaga, H. (2007b). Tyrosinase inhibitory activity of ethanol extracts from medicinal and edible plants cultivated in Okinawa and identification of a water-soluble inhibitor from the leaves of *Nandina domestica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71(9), 2316–2320. <https://doi.org/10.1271/bbb.70249>
- Masuda, T., Odaka, Y., Ogawa, N., Nakamoto, K., & Kuninaga, H. (2008a). Identification of geranic acid, a tyrosinase inhibitor in lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 597–601. <https://doi.org/10.1021/jf0728931>
- Masuda, T., Odaka, Y., Ogawa, N., Nakamoto, K., & Kuninaga, H. (2008b). Identification of geranic acid, a tyrosinase inhibitor in lemongrass (*Cymbopogon citratus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(2), 597–601. <https://doi.org/10.1021/jf0728931>
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., & Yonemori, S. (2005a). Screening for Tyrosinase Inhibitors among Extracts of Seashore Plants and Identification of Potent Inhibitors from *Garcinia subelliptica*. In *Biosci. Biotechnol. Biochem* (Vol. 69, Issue 1).
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., & Yonemori, S. (2005b). Screening for Tyrosinase Inhibitors among Extracts of Seashore Plants and Identification of Potent Inhibitors from *Garcinia subelliptica*. In *Biosci. Biotechnol. Biochem* (Vol. 69, Issue 1).
- Matějovský, L., & Pitschmann, V. (2018). New carrier made from glass nanofibres for the colorimetric biosensor of cholinesterase inhibitors. *Biosensors*, 8(2). <https://doi.org/10.3390/bios8020051>
- Matos, G. S., Pereira, S. G., Genisheva, Z. A., Gomes, A. M., Teixeira, J. A., Rocha, C. M. R., Alexandre, C., Manuel, J., Saraiva, A., & Pintado, M. (2021a). *Advances in Extraction Methods to Recover Added-Value Compounds from Seaweeds: Sustainability and Functionality*. <https://doi.org/10.3390/foods>
- Matos, G. S., Pereira, S. G., Genisheva, Z. A., Gomes, A. M., Teixeira, J. A., Rocha, C. M. R., Alexandre, C., Manuel, J., Saraiva, A., & Pintado, M. (2021b). *Advances in Extraction Methods to Recover Added-Value Compounds from Seaweeds: Sustainability and Functionality*. <https://doi.org/10.3390/foods>
- Mattes, W. B. (2020). In vitro to in vivo translation. In *Current Opinion in Toxicology* (Vols. 23–24, pp. 114–118). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.09.001>

- Meinita, M. D. N., Harwanto, D., Tirtawijaya, G., Negara, B. F. S. P., Sohn, J. H., Kim, J. S., & Choi, J. S. (2021). Fucosterol of marine macroalgae: Bioactivity, safety and toxicity on organism. In *Marine Drugs* (Vol. 19, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/md19100545>
- Meregalli, M. M. (2017). *Estudo comparativo de diferentes métodos de extração de compostos bioativos da casca do araçá-vermelho (Psidium cattleianum Sabine)*. https://bibliotecadigital.ipb.pt/bitstream/10198/23529/1/Pedrosa_Mariana.pdf
- Milatovic, D., Zaja-Milatovic, S., Breyer, R. M., Aschner, M., & Montine, T. J. (2011). Neuroinflammation and Oxidative Injury in Developmental Neurotoxicity. In *Reproductive and Developmental Toxicology* (pp. 847–854). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-382032-7.10064-5>
- Mingjiang Geng. (2012). Free radical scavenging activities of pigment extract from Hibiscus syriacus L. petals in vitro. *AFRICAN JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY*, 11(2). <https://doi.org/10.5897/ajb11.3037>
- Moreira, C. (2014). Pigmentos fotossintéticos. *Revista de Ciência Elementar*, 2(3). <https://doi.org/10.24927/rce2014.196>
- Mota, W. M. ;, Barros, M. L. ;, Cunha, P. E. L. ;, Santana, M. V. A. ;, Stevam, C. S. ;, Leopoldo, P. T. G., & Fernandes, R. P. M. (2012). Avaliação da inibição da acetilcolinesterase por extratos de plantas medicinais. In *Rev. Bras. Pl. Med.*
- MSD. (2022a). *Medicamentos usados para tratar a depressão*. <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/casa/multimedia/table/medicamentos-usados-para-tratar-a-depressao#>
- MSD. (2022b). *Medicamentos utilizados para tratar a doença de Parkinson - Manual MSD Versão Saúde para a Família*. <https://www.msdmanuals.com/pt-pt/casa/multimedia/table/medicamentos-utilizados-para-tratar-a-doen%C3%A7a-de-parkinson#>
- Nagatsu, T., Nakashima, A., Watanabe, H., Ito, S., & Wakamatsu, K. (2022). Neuromelanin in Parkinson's Disease: Tyrosine Hydroxylase and Tyrosinase. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(8), 4176. <https://doi.org/10.3390/ijms23084176>
- Nakanishi, K., Sakakima, H., Norimatsu, K., Otsuka, S., Takada, S., Tani, A., & Kikuchi, K. (2021). Effect of low-intensity motor balance and coordination exercise on cognitive functions, hippocampal A β deposition, neuronal loss, neuroinflammation, and oxidative stress in a mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 337. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2020.113590>
- Newman, M., Ebrahimie, E., & Lardelli, M. (2014). Using the zebrafish model for Alzheimer's disease research. *Frontiers in Genetics*, 5(JUN). <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00189>
- Niyonambaza, S. D., Kumar, P., Xing, P., Mathault, J., Koninck, P. de, Boisselier, E., Boukadoum, M., & Miled, A. (2019). A Review of neurotransmitters sensing methods for neuro-engineering research. *Applied Sciences (Switzerland)*, 9(21). <https://doi.org/10.3390/app9214719>
- OECD/OCDE. (1998). *OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages*.
- Oliveira, C. (2015). *Prospecção de compostos bioativos nas macroalgas Himanthalia elongata, Laminaria ochroleuca e Undaria pinnatifida*. [Dissertação de Mestrado, Universidade de Aveiro]. <https://ria.ua.pt/bitstream/10773/15672/1/Tese%20Defenitiva-%20C%3%a1tia%20Oliveira.pdf>

- Panchompoo, J., Aldous, L., Kabeshov, M., Pilgrim, B. S., Donohoe, T. J., & Compton, R. G. (2012). A green approach to Fenton chemistry: Mono-hydroxylation of salicylic acid in aqueous medium by the electrogeneration of Fenton's reagent. *New Journal of Chemistry*, *36*(5), 1265–1272. <https://doi.org/10.1039/c2nj21007j>
- Pangestuti, R., & Siahaan, E. A. (2018). Seaweed-derived carotenoids. In *Bioactive Seaweeds for Food Applications: Natural Ingredients for Healthy Diets* (pp. 95–107). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813312-5.00005-4>
- Patra, J. K., Lee, S. W., Park, J. G., & Baek, K. H. (2017). Antioxidant and Antibacterial Properties of Essential Oil Extracted from an Edible Seaweed *Undaria Pinnatifida*. *Journal of Food Biochemistry*, *41*(1). <https://doi.org/10.1111/jfbc.12278>
- Pedro, B., Guedes, L., André, R., Gaspar, H., Vaz, P., Ascensão, L., Melo, R., & Luísa Serralheiro, M. (2021). *Undaria pinnatifida* (U. pinnatifida) bioactivity: Antioxidant, gastro-intestinal motility, cholesterol biosynthesis and liver cell lines proteome. *Journal of Functional Foods*, *83*. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104567>
- Pereira, L., & Valado, A. (2021). The Seaweed Diet in Prevention and Treatment of the Neurodegenerative Diseases. *Marine Drugs*, *19*(3). <https://doi.org/10.3390/md19030128>
- Pereira, M. O. S. (2010). *Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioativos*.
- Petronilho, E. da C., Pinto, A., & Villar, J. D. F. (2011). *Acetilcolinesterase: Alzheimer e Guerra Química*. http://rmct.ime.eb.br/arquivos/RMCT_3_tri_2011/RMCT_067_E5A_11.pdf
- Rafiquzzaman, S. M., Kim, E. Y., Lee, J. M., Mohibullah, M., Alam, M. B., Soo Moon, I., Kim, J. M., & Kong, I. S. (2015). Anti-Alzheimers and anti-inflammatory activities of a glycoprotein purified from the edible brown alga *Undaria pinnatifida*. *Food Research International*, *77*, 118–124. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.021>
- Raquel, M., & Gomes, S. (2015). *Estudo da reprodução e desenvolvimento embrionário de Garra rufa (Heckel,1843), com vista à sua produção em Aquacultura*.
- Saha, R. N., & Pahan, K. (2006). Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene in Glial Cells. *Antioxidants & Redox Signaling*, Volume 8(Mary Ann Liebert, Inc).
- Saleem, S., & Kannan, R. R. (2018). Zebrafish: an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery. In *Cell Death Discovery* (Vol. 4, Issue 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41420-018-0109-7>
- Salim, S. (2017). Oxidative stress and the central nervous system. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *360*(1), 201–205. <https://doi.org/10.1124/jpet.116.237503>
- Sanjeewa, K. K. A., Herath, K. H. I. N. M., Yang, H.-W., Choi, C. S., & Jeon, Y.-J. (2021). Anti-Inflammatory Mechanisms of Fucoidans to Treat Inflammatory Diseases: A Review. *Marine Drugs*, *19*(12), 678. <https://doi.org/10.3390/md19120678>
- Schepers, M., Martens, N., Tiane, A., Vanbrabant, K., Liu, H. B., Lütjohann, D., Mulder, M., & Vanmierlo, T. (2020). Edible seaweed-derived constituents: An undisclosed source of neuroprotective compounds. *Neural Regeneration Research*, *15*(5), 790–795. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.268894>

- Silva, M. M. C. L., dos Santos Lisboa, L., Paiva, W. S., Batista, L. A. N. C., Luchiari, A. C., Rocha, H. A. O., & Camara, R. B. G. (2022). Comparison of in vitro and in vivo antioxidant activities of commercial fucoidans from *Macrocystis pyrifera*, *Undaria pinnatifida*, and *Fucus vesiculosus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 216, 757–767. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.110>
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. In *Methods in enzymology* (Vol. 299).
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). *Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes*. 28(4), 1057–1060.
- Soares, C. (2015). *Validação do método Fast Blue BB para quantificação de compostos fenólicos totais em alimentos*.
- Soares, C., Paíga, P., Marques, M., Neto, T., Carvalho, A. P., Paiva, A., Simões, P., Costa, L., Bernardo, A., Fernández, N., Pinto, E., Almeida, A., Bronze, M. R., Delerue-Matos, C., & Grosso, C. (2021). Multi-step subcritical water extracts of *fucus vesiculosus* l. And *codium tomentosum* stackhouse: Composition, health-benefits and safety. *Processes*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/pr9050893>
- Steger-Hartmann, T., & Raschke, M. (2020). Translating in vitro to in vivo and animal to human. In *Current Opinion in Toxicology* (Vols. 23–24, pp. 6–10). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.cotox.2020.02.003>
- Stengel, D. B. (2015). *Natural Products From Marine Algae Methods and Protocols* (D. B. Stengel & S. Connan, Eds.). <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2684-8>
- Stewart, A. M., Braubach, O., Spitsbergen, J., Gerlai, R., & Kalueff, A. v. (2014). Zebrafish models for translational neuroscience research: From tank to bedside. *Trends in Neurosciences*, 37(5), 264–278. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2014.02.011>
- Subaraja, M., Krishnan, D. A., Hillary, V. E., Raja, T., Raja, W., Mathew, P., Ravikumar, S., Paulraj, M. G., & Ignacimuthu, S. (2020). Fucoidan serves a neuroprotective effect in an Alzheimer's disease model. In *Frontiers in Bioscience* (Vol. 12, Issue 1).
- Sucupira, N. R., Silva, A. B., Pereira, G., & Costa, J. N. (2012). Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. In *263 UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde* (Vol. 14, Issue 4).
- Tamagno, E., Guglielmotto, M., Vasciaveo, V., & Tabaton, M. (2021, September 1). Oxidative stress and beta amyloid in alzheimer's disease. Which comes first: The chicken or the egg? *Antioxidants*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/antiox10091479>
- Ting Wong, C. G., Bottiglieri, T., & Snead, O. C. (2003). GABA, γ -hydroxybutyric acid, and neurological disease. *Annals of Neurology*, 54(S6), S3–S12. <https://doi.org/10.1002/ana.10696>
- Titton, M. M. (2018). *Impregnação de nanopartículas de prata em filmes de polissulfona funcionalizados por radiação ultravioleta*. <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/193012/001088695.pdf?sequence=1>
- Tsukui, A., & Rezende, C. M. (2014). Microwave assisted extraction and green chemistry. *Revista Virtual de Química*, 6(6), 1713–1725. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140111>

- Uys, G. (2022, May 18). *Divers remove tons of invasive seaweed from Fiordland*. STUFF, Site. <https://www.stuff.co.nz/business/farming/aquaculture/128625086/divers-remove-tons-of-invasive-seaweed-from-fiordland>
- Vecchio, I., Sorrentino, L., Paoletti, A., Marra, R., & Arbitrio, M. (2021). The State of The Art on Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Journal of Central Nervous System Disease*, *13*, 117957352110291. <https://doi.org/10.1177/11795735211029113>
- Wang, L., Park, Y. J., Jeon, Y. J., & Ryu, B. M. (2018, October 1). Bioactivities of the edible brown seaweed, *Undaria pinnatifida*: A review. *Aquaculture*, *495*, 873–880. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.079>
- Wang, Q., Timberlake, M. A., Prall, K., & Dwivedi, Y. (2017). The recent progress in animal models of depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, *77*, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2017.04.008>
- Wang, X., Zhang, J. B., He, K. J., Wang, F., & Liu, C. F. (2021). Advances of Zebrafish in Neurodegenerative Disease: From Models to Drug Discovery. *Frontiers in Pharmacology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.713963>
- Wei, Z., Li, X., Li, X., Liu, Q., & Cheng, Y. (2018). Oxidative Stress in Parkinson's Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00236>
- World Health Organization. (2012). *Dementia a public health priority*.
- World Health Organization. (2021a). *Depression*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/depression>
- World Health Organization. (2021b). *World failing to address dementia challenge*. <https://www.who.int/news/item/02-09-2021-world-failing-to-address-dementia-challenge>
- World Health Organization. (2022). *Parkinson disease A public health approach*.
- Xiao, X. H., Yuan, Z. Q., & Li, G. K. (2013). Preparation of phytosterols and phytol from edible marine algae by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*, *104*, 284–289. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2012.11.032>
- Xiao, X., Si, X., Yuan, Z., Xu, X., & Li, G. (2012). Isolation of fucoxanthin from edible brown algae by microwave-assisted extraction coupled with high-speed countercurrent chromatography. *Journal of Separation Science*, *35*(17), 2313–2317. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200231>
- Xie, X., Chen, C., & Fu, X. (2021). Screening α -glucosidase inhibitors from four edible brown seaweed extracts by ultra-filtration and molecular docking. *LWT - Food Science and Technology*, *138*. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110654>
- Yoon, N. Y., Chung, H. Y., Kim, H. R., & Choi, J. S. (2008). Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fisheries Science*, *74*(1), 200–207. <https://doi.org/10.1111/j.1444-2906.2007.01511.x>
- Zeman, J., Vetchý, D., Franc, A., Pavloková, S., Pitschmann, V., & Matějovský, L. (2017). The development of a butyrylcholinesterase porous pellet for innovative detection of cholinesterase

- inhibitors. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 109, 548–555. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2017.09.015>
- Zeng, J., Luan, F., Hu, J., Liu, Y., Zhang, X., Qin, T., Zhang, X., Liu, R., & Zeng, N. (2022). Recent research advances in polysaccharides from *Undaria pinnatifida*: Isolation, structures, bioactivities, and applications. In *International Journal of Biological Macromolecules* (Vol. 206, pp. 325–354). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.138>
- Zhang, H., Pang, Z., & Han, C. (2014). *Undaria pinnatifida* (Wakame): A Seaweed with Pharmacological Properties. *Science International*, 2(2), 32–36. <https://doi.org/10.17311/sciintl.2014.32.36>
- Zhang, H., Tang, Y., Zhang, Y., Zhang, S., Qu, J., Wang, X., Kong, R., Han, C., & Liu, Z. (2015). Fucoxanthin: A Promising Medicinal and Nutritional Ingredient. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/723515>
- Zhang, J., An, Q., Li, W., Chai, L., Hu, W., Wang, Y., Su, S., He, Y., Li, C., & Sun, D. (2021). Rationally designed lipid droplets-selective two-photon nitric oxide probe for high-fidelity neuroinflammation evaluation. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 345. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.130329>
- Zhao, Y., Zheng, Y., Wang, J., Ma, S., Yu, Y., White, W. L., Yang, S., Yang, F., & Lu, J. (2018a). Fucoïdan extracted from *Undaria pinnatifida*: Source for nutraceuticals/functional foods. *Marine Drugs*, 16(9). <https://doi.org/10.3390/md16090321>
- Zhao, Y., Zheng, Y., Wang, J., Ma, S., Yu, Y., White, W. L., Yang, S., Yang, F., & Lu, J. (2018b). Fucoïdan extracted from *Undaria pinnatifida*: Source for nutraceuticals/functional foods. *Marine Drugs*, 16(9). <https://doi.org/10.3390/md16090321>
- Zhen, X. H., Quan, Y. C., Jiang, H. Y., Wen, Z. S., Qu, Y. le, & Guan, L. P. (2015). Fucosterol, a sterol extracted from *Sargassum fusiforme*, shows antidepressant and anticonvulsant effects. *European Journal of Pharmacology*, 768, 131–138. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.10.041>

Anexos

Anexo A – Dados utilizados para o cálculo dos rendimentos das extrações

A tabela A.1 apresenta os dados das massas iniciais de alga pesadas no início das extrações e as massas de extratos secos obtidos no final das extrações, em gramas, necessários para o cálculo do rendimento (%).

Tabela A. 1. Dados das massas iniciais de alga e massas dos extratos secos obtidos (g) para cada tipo de extração com os diferentes solventes e condições (tempo de extração: 1h e 2h; temperaturas 25°C e 40 °C; rácio: 1:10 e 1:20 g:mL).

Tempo de Extração	Temperatura	Rácio (sólido: solvente)	Solventes	Massa alga inicial (g)	Massa do extrato seco (g)	Rendimento (%)
1h	25 °C	1:10	H ₂ O: acetona	1,051	0,111	10,6
			H ₂ O: etanol	1,026	0,096	9,36
			H ₂ O: metanol	1,012	0,078	7,71
			Etanol	1,012	0,099	9,78
			Metanol	1,023	0,115	11,2
			Diclorometano	1,087	0,011	1,01
		Acetona	1,088	0,088	8,09	
		1:20	H ₂ O: acetona	1,015	0,143	14,1
			H ₂ O: etanol	1,0126	0,091	8,08
			H ₂ O: metanol	1,043	0,111	10,6
			Etanol	1,022	0,101	9,88
			Metanol	1,123	0,135	12,0
	Diclorometano		1,045	0,006	0,570	
	Acetona	1,110	0,08	7,21		
	40 °C	1:10	H ₂ O: acetona	1,052	0,119	11,3
			H ₂ O: etanol	1,011	0,113	11,2
			H ₂ O: metanol	1,066	0,053	4,97
			Etanol	1,016	0,105	10,33
			Metanol	1,005	0,065	6,47
			Acetona	1,019	0,103	10,1
		1:20	H ₂ O: acetona	1,091	0,151	13,8
			H ₂ O: etanol	1,032	0,173	16,8
			H ₂ O: metanol	1,243	0,18	14,5
			Etanol	1,095	0,148	13,5
Metanol			1,010	0,183	18,1	
Acetona			1,127	0,091	8,07	
2h	25 °C	1:10	H ₂ O: acetona	1,125	0,097	8,62
			H ₂ O: etanol	1,007	0,107	10,6
			H ₂ O: metanol	1,194	0,096	8,04
			Etanol	1,073	0,131	12,2
			Metanol	1,182	0,118	9,98
			Diclorometano	1,300	0,013	1,00
		Acetona	1,093	0,055	5,03	
		1:20	H ₂ O: acetona	1,007	0,137	13,6
			H ₂ O: etanol	1,120	0,159	14,2
			H ₂ O: metanol	1,032	0,149	14,4
			Etanol	1,016	0,114	11,2
			Metanol	1,002	0,161	16,1
	Diclorometano		1,028	0,007	0,68	
	Acetona	1,054	0,111	10,5		
	40 °C	1:10	H ₂ O: acetona	1,019	0,119	11,7
			H ₂ O: etanol	1,135	0,135	11,9
			H ₂ O: metanol	1,009	0,103	10,2
			Etanol	1,141	0,133	11,7

<i>Tempo de Extração</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Rácio (sólido: solvente)</i>	<i>Solventes</i>	<i>Massa alga inicial (g)</i>	<i>Massa do extrato seco (g)</i>	<i>Rendimento (%)</i>
			Metanol	1,020	0,084	8,24
			Acetona	1,070	0,129	12,1
		1:20	H ₂ O: acetona	1,044	0,123	11,8
			H ₂ O: etanol	1,013	0,163	16,1
			H ₂ O: metanol	1,001	0,177	17,7
			Etanol	1,032	0,121	11,7
			Metanol	1,005	0,120	11,9
			Acetona	1,173	0,080	6,82

Anexo B – Dados utilizados para o cálculo do TPC

A tabela B.1 **Erro! A origem da referência não foi encontrada.** apresenta os dados das massas de extratos secos obtidos no final das extrações, em gramas, o volume de metanol adicionado (mL) e a concentração de extrato obtida (mg/mL).

Tabela B. 1. Dados utilizados para o cálculo da concentração de extrato (mg/mL) necessária para o cálculo do TPC.

Tempo de Extração	Temperatura	Rácio (sólido: solvente)	Solventes	Massa do extrato seco (g)	Volume de metanol adicionado (mL)	Concentração Extrato (mg/mL)
1h	25 °C	1:10	H ₂ O: acetona	0,111	2,44	45,5
			H ₂ O: etanol	0,096	1,92	50,0
			H ₂ O: metanol	0,078	2,00	39,0
			Etanol	0,099	1,98	50,0
			Metanol	0,115	2,72	42,3
			Diclorometano	0,011	2,22	4,95
		Acetona	0,088	2,20	40,0	
		1:20	H ₂ O: acetona	0,143	2,86	50,0
			H ₂ O: etanol	0,091	2,40	37,9
			H ₂ O: metanol	0,111	2,22	50,0
			Etanol	0,101	2,02	50,0
			Metanol	0,135	2,70	50,0
	Diclorometano		0,006	2,12	2,83	
	40 °C	1:10	H ₂ O: acetona	0,119	2,38	50,0
			H ₂ O: etanol	0,113	2,26	50,0
			H ₂ O: metanol	0,053	2,06	25,7
			Etanol	0,105	2,10	50,0
			Metanol	0,065	2,80	23,2
Acetona			0,103	2,06	50,0	
1:20	H ₂ O: acetona	0,151	3,02	50,0		
	H ₂ O: etanol	0,173	3,46	50,0		
	H ₂ O: metanol	0,18	3,60	50,0		
	Etanol	0,148	2,96	50,0		
	Metanol	0,183	3,66	50,0		
	Acetona	0,091	1,82	50,0		
2h	25 °C	1:10	H ₂ O: acetona	0,097	1,94	50,0
			H ₂ O: etanol	0,107	2,14	50,0
			H ₂ O: metanol	0,096	1,92	50,0
			Etanol	0,131	2,62	50,0
			Metanol	0,118	2,36	50,0
			Diclorometano	0,013	2,26	5,75
		Acetona	0,055	1,10	50,0	
		1:20	H ₂ O: acetona	0,137	2,74	50,0
			H ₂ O: etanol	0,159	3,18	50,0
			H ₂ O: metanol	0,149	2,98	50,0
			Etanol	0,114	2,28	50,0
			Metanol	0,161	3,22	50,0
	Diclorometano		0,007	2,14	3,27	
	Acetona	0,111	2,22	50,0		
	40 °C	1:10	H ₂ O: acetona	0,119	2,38	50,0
			H ₂ O: etanol	0,135	2,70	50,0
			H ₂ O: metanol	0,103	2,06	50,0
			Etanol	0,133	2,66	50,0
Metanol			0,084	1,68	50,0	
Acetona			0,129	2,58	50,0	
1:20	H ₂ O: acetona	0,123	2,46	50,0		
	H ₂ O: etanol	0,163	3,26	50,0		
	H ₂ O: metanol	0,177	3,54	50,0		
	Etanol	0,121	2,42	50,0		
	Metanol	0,120	2,40	50,0		

<i>Tempo de Extração</i>	<i>Temperatura</i>	<i>Rácio (sólido: solvente)</i>	<i>Solventes</i>	<i>Massa do extrato seco (g)</i>	<i>Volume de metanol adicionado (mL)</i>	<i>Concentração Extrato (mg/mL)</i>
			Acetona	0,080	1,60	50,0