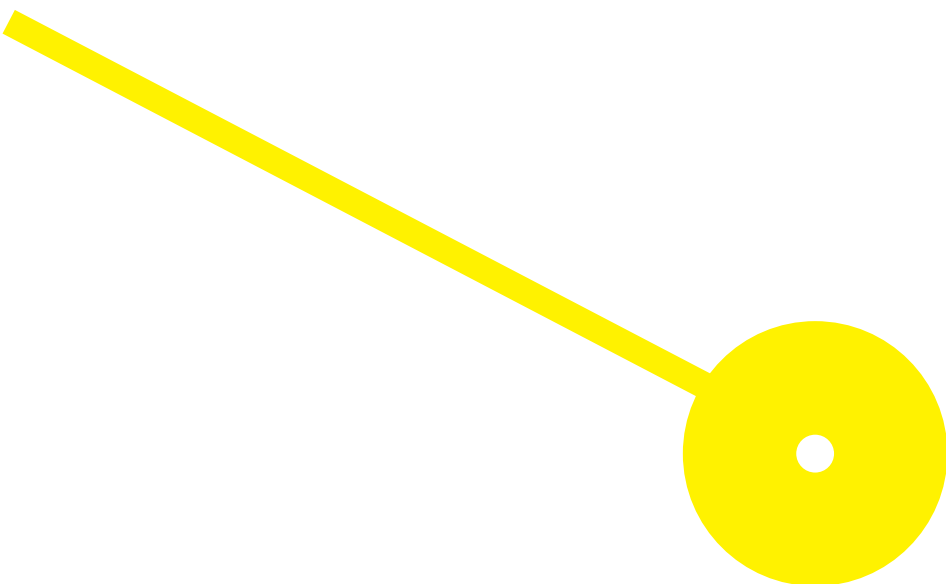




Atividade antioxidante e
hepatoprotetora de extratos da alga
Undaria pinnatifida (Wakame)

Beatriz Manuela Dias Cruz

09/2023





Atividade antioxidante e hepatoprotetora de extratos da alga *Undaria pinnatifida* (Wakame)

Autor

Beatriz Manuela Dias Cruz

Orientador

Prof. Doutora Cláudia Marta Libreiro de Pinho, Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA),
Escola Superior de Saúde (ESS) do Instituto Politécnico do Porto (IPP)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmácia – Ramo em Tecnologia do Medicamento e de Produtos de Saúde pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

Agradecimentos

Estes dois anos de mestrado foram verdadeiramente desafiantes. Trouxe muitos altos e baixos quer na minha vida pessoal como profissional, contudo foi o aprazimento por esta área que me ajudou a ultrapassar tudo o que era necessário e a concretizar este trabalho.

Em primeiro lugar, quero deixar o meu agradecimento à minha orientadora, a Prof. Doutora Cláudia Pinho, pela orientação, pelo apoio incansável, pela confiança, pela ajuda, pela disponibilidade, mas sobretudo, por acreditar, sempre, em mim e nas minhas capacidades.

À equipa do CISA e a todos os colegas por toda a ajuda. Permitiram a realização deste trabalho, e principalmente, a execução da parte laboratorial.

Um obrigado muito especial para os meus pais, para os meus avós e familiares e, para o meu namorado, por nunca desistirem de mim, por me incentivarem e nunca me deixarem desistir. Obrigada por me estarem em todos os momentos importantes da minha vida (até nos mais difíceis).

Por último, mas não menos importante, um obrigado às minhas colegas e amigas de trabalho, por serem tão disponíveis e me apoiarem.

A todas as pessoas que não mencionei, todavia contribuíram para a realização deste trabalho, o meu mais genuíno obrigada!

Resumo

Introdução: O consumo de algas marinhas aumentou nos últimos anos. As algas possuem compostos bioativos, incluindo polissacáridos sulfatados, polifenóis, e pigmentos naturais, empregues na saúde humana e animal. A alga *Undaria pinnatifida*, uma espécie invasora tem demonstrado várias atividades biológicas. Face à procura crescente de novos agentes antioxidantes, uma opção pode ser o estudo de algas. **Objetivos:** Avaliar a atividade antioxidante, *in vitro*, de extratos de *U. pinnatifida* recorrendo a diferentes técnicas extrativas e solventes. **Métodos:** Estudo experimental com obtenção de extratos aquosos e etanólicos de *U. pinnatifida* para avaliação de atividades *in vitro*, nomeadamente, a atividade antioxidante (ensaio do DPPH, ferrozina, H₂O₂ e ABTS) e a atividade hepatoprotetora em células HepG₂. Determinou-se o teor de compostos fenólicos e de flavonoides. **Resultados:** O extrato etanólico apresentou os melhores resultados no ensaio do DPPH (IC₅₀= 46,8 ± 1,8 µg/mL), do H₂O₂ (IC₅₀= 4,8 ± 0,2 µg/mL), no teor de compostos fenólicos (29,4 ± 0,0 mg GAE/g) e flavonoides (2,8 ± 0,3 mg QE/g). O extrato etanólico demonstrou um efeito protetor nas células que pode estar associado à indução de defesas antioxidantes intracelulares. **Conclusão:** Os resultados, em particular para o extrato etanólico, demonstram uma potencial atividade antioxidante e hepatoprotetora, providenciando uma base para estudos futuros, no sentido de elucidar os compostos presentes e mecanismos de ação dos extratos.

Palavras-chave: *Undaria pinnatifida*; Alga Wakame; Atividade Antioxidante; Atividade Hepatoprotetora

Abstract

Introduction: The consumption of seaweed has increased in recent years. Algae contain bioactive compounds, including sulfated polysaccharides, polyphenols, and natural pigments, used in human and animal health. The algae *Undaria pinnatifida*, an invasive species, has demonstrated several biological activities. In view of the growing demand for new antioxidant agents, one option may be to study algae. **Objectives:** To evaluate the *in vitro* antioxidant activity of *U. pinnatifida* extracts using different extractive techniques and solvents. **Methods:** Experimental study obtaining aqueous and ethanolic extracts of *U. pinnatifida* to evaluate different *in vitro* activities, namely, antioxidant activity (DPPH, ferrozine, H₂O₂ and ABTS assay) and hepatoprotective activity in HepG₂ cells. The content of phenolic compounds and flavonoids was also determined. **Results:** The ethanolic extract showed the best results in the DPPH assay (IC₅₀= 46,8 ± 1,8 µg/mL), H₂O₂ (IC₅₀= 4,8 ± 0,2 µg/mL), and the content of phenolic compounds (29,4 ± 0,0 mg GAE/g) and flavonoids (2,8 ± 0,3 mg QE/g). The ethanolic extract demonstrated a protective effect on cells that may be associated with the induction of intracellular antioxidant defenses. **Conclusion:** The results, in particular for the ethanolic extract, demonstrate a potential antioxidant and hepatoprotective activity, providing a basis for future studies, in order to elucidate the compounds present and mechanisms of action of the extracts.

Keywords: *Undaria pinnatifida*; Algae Wakame; Antioxidant activity; Hepatoprotective activity

Índice

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos	VIII
Índice de Figuras.....	XI
Índice de Tabelas.....	XII
1. Introdução.....	1
1.1. Descrição da alga <i>Undaria pinnatifida</i>	2
1.2. Composição química da alga <i>Undaria pinnatifida</i>	3
1.3. Atividades biológicas e segurança da alga <i>Undaria pinnatifida</i>	5
1.3.1 Atividade anticancerígena	5
1.3.2. Atividade anti-hipertensora	7
1.3.3. Atividade anticoagulante.....	8
1.3.4. Atividade anti-inflamatória	9
1.3.5. Atividade antidiabética.....	10
1.3.6. Atividade antimicrobiana.....	11
1.3.7. Atividade antioxidante e hepatoprotetora.....	12
1.4. Relevância do Tema	16
1.5. Objetivos	17
2. Material e Métodos	18
2.1. Reagentes.....	18
2.2. Obtenção e preparação dos extratos de <i>U. pinnatifida</i>	18
2.2.1. Extração com água destilada como solvente	19
2.2.2. Extração com etanol como solvente	19
2.3. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	20
2.3.1. Ensaio do DPPH.....	20
2.3.2. Ensaio da atividade quelante de ferro	20
2.3.3. Ensaio do peróxido de hidrogénio	21
2.3.4. Ensaio do ABTS	21
2.4. Determinação de compostos fenólicos.....	21
2.5. Determinação do teor de flavonoides	22
2.6. Cultura Celular	22
2.6.1. Toxicidade Celular	22

2.6.2. Proteção de extratos contra a toxicidade induzida por <i>t</i> -BOOH em células HepG ₂	23
2.7. Análise estatística	23
3. Resultados	24
3.1. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	24
3.1.1. Avaliação do ensaio do DPPH	24
3.1.2. Avaliação do ensaio da atividade quelante do ferro.....	25
3.1.3. Avaliação do ensaio do peróxido de hidrogénio.....	25
3.1.4. Avaliação do ensaio do ABTS	26
3.2. Teor Total de Compostos Fenólicos	26
3.3. Teor Total de Flavonoides	27
3.4. Proteção de extratos contra a toxicidade induzida por <i>t</i> -BOOH em células HepG ₂	27
4. Discussão	30
5. Conclusão.....	37
Referências Bibliográficas.....	39

Lista de Abreviaturas, Siglas e Acrónimos

ABTS	2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolína-6-sulfónico)
Ala	Alanina
AlCl ₃	Cloreto de Alumínio
ALP	Fosfatase Alcalina
AMPK	Proteína quinase ativada por Adenosina Monofosfato
Asn	Asparagina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CAT	Catalase
CCl ₄	Tetracloroeto de Carbono
CISA	Centro de Investigação em Saúde e Ambiente
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
CUPRA	Capacidade Antioxidante Redutora do Cobre
DCV	Doenças Cardiovasculares
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ESS	Escola Superior de Saúde
EPA	Ácido Eicosapentanóico
EXT 1	Extrato 1
EXT 2	Extrato 2
EXT 3	Extrato 3
EXT 4	Extrato 4
FBS	Soro Fetal Bovino
FeSO ₄	Sulfato de Ferro (II)
FRAP	Poder Antioxidante de Redução de Ferro
F0	Fucoidano Bruto
F1	Fração 1
F2	Fração 2
F3	Fração 3
Gly	Glicina
GOT	Glutamato-oxaloacetato Transaminase

GPT	Glutamato-piruvato Transaminase
GPx	Glutathione Peroxidase
HepG ₂	Células de hepatoma humano
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogénio
IC ₅₀	Concentração Inibitória Média
IECA	Inibição da Enzima Conversora de Angiotensina I
Ile	Isoleucina
IL-6	Interleucina-6
IL-1 β	Interleucina-1 β
iNOS	Sintase Óxido Nítrico Indutível
IPP	Instituto Politécnico do Porto
LDH	Lactato Desidrogenase
Leu	Leucina
LPS	Lipopolissacáridos
Lys	Lisina
MDA	Malondialdeído
MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
MICs	Concentração Mínima Inibitória
MMP-1	Metaloproteinase 1 da Matriz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil Tetrazólio
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
ND	Não Determinado
NF- κ B	Fator Nuclear Kappa B
NO	Óxido Nítrico
PGE ₂	Prostagladina E ₂
Phe	Fenilalanina
QE	Equivalentes de Quercetina
ROS	Espécies Reativas de Óxigénio
SOD	Superóxido Dismutase
S1	Sulfatado 1
S2	Sulfatado 2

t -BOOH	Hidroperóxido de Tert-Butil
TGF- β	Fator de Crescimento Transformante- β
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TPTZ	2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
Tyr	Tirosina
UPGP	Glicoproteína de <i>U. pinnatifida</i>

Índice de Figuras

Figura 1. Exemplos de espécies de algas verdes, vermelhas e castanhas	2
Figura 2. Estutura da alga wakame.....	3
Figura 3. Estrutura básica do fucoídano isolado da <i>U. pinnatifida</i>	3
Figura 4. Estrutura química da fucoxantina	4
Figura 5. Efeitos do fucoídano na lesão hepática.....	15
Figura 6. Citotoxicidade nas células HepG ₂ de diferentes concentrações do extrato etanólico de <i>U. pinnatifida</i> ao fim de 24h e 48h.	28
Figura 7. Toxicidade nas células HepG ₂ induzida pelo <i>t</i> -BOOH após incubação do tóxico na concentração de 1 mM, 2,5 mM e 5 mM, por diferentes tempos.....	29
Figura 8. Proteção do extrato etanólico de alga <i>U. pinnatifida</i> nas células HepG ₂ . As células HepG ₂ foram tratadas ou não (controlo) com <i>t</i> -BOOH (5 mM) por 4 horas (pré-incubação).....	29

Índice de Tabelas

Tabela 1. Extratos de <i>U. pinnatifida</i> utilizados no estudo.....	18
Tabela 2. Rendimento das extrações efetuadas com a alga <i>U. pinnatifida</i>	24
Tabela 3. Resultados do ensaio de DPPH, <i>in vitro</i> , nos diferentes extratos na alga <i>U. pinnatifida</i>	25
Tabela 4. Resultados do ensaio da ferrozina, <i>in vitro</i> , nos diferentes extratos na alga <i>U. pinnatifida</i>	25
Tabela 5. Resultados do ensaio do peróxido de hidrogénio, <i>in vitro</i> , nos diferentes extratos na alga <i>U. pinnatifida</i>	26
Tabela 6. Resultados do ensaio do ABTS, <i>in vitro</i> , nos diferentes extratos na alga <i>U. pinnatifida</i>	26
Tabela 7. Teor de compostos fenólicos totais dos extratos na <i>U. pinnatifida</i>	27
Tabela 8. Teor de flavonoides dos extratos na <i>U. pinnatifida</i>	27

1. Introdução

O oceano representa um recurso abundante de novos compostos com potencial para a indústria farmacêutica e cosmética, para a indústria dos suplementos alimentares, assim como para a indústria dos agroquímicos (Carté, 1996). O consumo de algas marinhas aumentou progressivamente, nos últimos tempos. Estas são consideradas importantes fontes alimentares, uma vez que são ricas em nutrientes, nomeadamente em proteínas (até 47% do peso seco nas espécies vermelhas), aminoácidos, vitaminas e minerais. Destaca-se o baixo teor de gordura, com uma relação saudável de ácidos gordos ómega-6/ómega-3, e alto teor de fibra alimentar, que pode chegar a 50% do peso seco em espécies de algas castanhas, com a fibra solúvel como fração predominante (Quitral et al., 2021).

As algas possuem ainda determinados compostos bioativos, incluindo polissacáridos sulfatados (fucoídano), polifenóis (florotaninos), e pigmentos naturais (fucoxantina, β -caroteno, clorofilas, xantofilas) (Cassani et al., 2022), investigados como ingredientes funcionais para serem empregues na saúde humana e animal (Hwang et al., 2014; Neri, Rohmah, Ticar, Palmos, & Choi, 2019). Desta forma, as algas têm sido tradicionalmente utilizadas na alimentação humana, na ração animal, como fertilizantes e exploradas pela indústria de ficocolóides para a extração de agar-agar, carragenina e alginato (Kadam et al., 2015).

Os compostos bioativos presentes nas algas têm sido analisados face à sua atividade anti-inflamatória, antivírica, anticancerígena, anti-trombótica e anticoagulante, assim como face à sua ação no excesso de peso, hipertensão e dislipidemia. Contudo, a elevada procura de algas marinhas para produção, tem levado a uma grande quantidade de subprodutos, que acabam por retornar ao oceano. Este retorno dos subprodutos tem provocado uma contaminação do meio ambiente e do ecossistema marinho. Por exemplo, em 2013 na província de Jeonnam, na Coreia do Sul, a produção total de algas marinhas foi de aproximadamente 1 milhão de toneladas (70% a 80% da produção total de algas marinhas na Coreia), das quais 45000 a 50000 toneladas foram, anualmente, rejeitadas (Hwang et al., 2014; Neri et al., 2019).

As algas marinhas, normalmente, são agrupadas em três grupos: as algas castanhas (Phaeophyta), algas verdes (Chlorophyta) e algas vermelhas (Rhodophyta) (Xu, Huang, & Cheong, 2017) (Figura 1). As cores das algas marinhas estão relacionadas com os pigmentos, sendo a clorofila o pigmento associado à cor das algas verdes, a ficobilina à das algas vermelhas e a fucoxantina à das algas castanhas. As espécies mais amplamente consumidas pertencem aos géneros *Undaria* (wakame), *Porphyra* (nori) e *Laminaria* (kombu) (Singh et al., 2021).

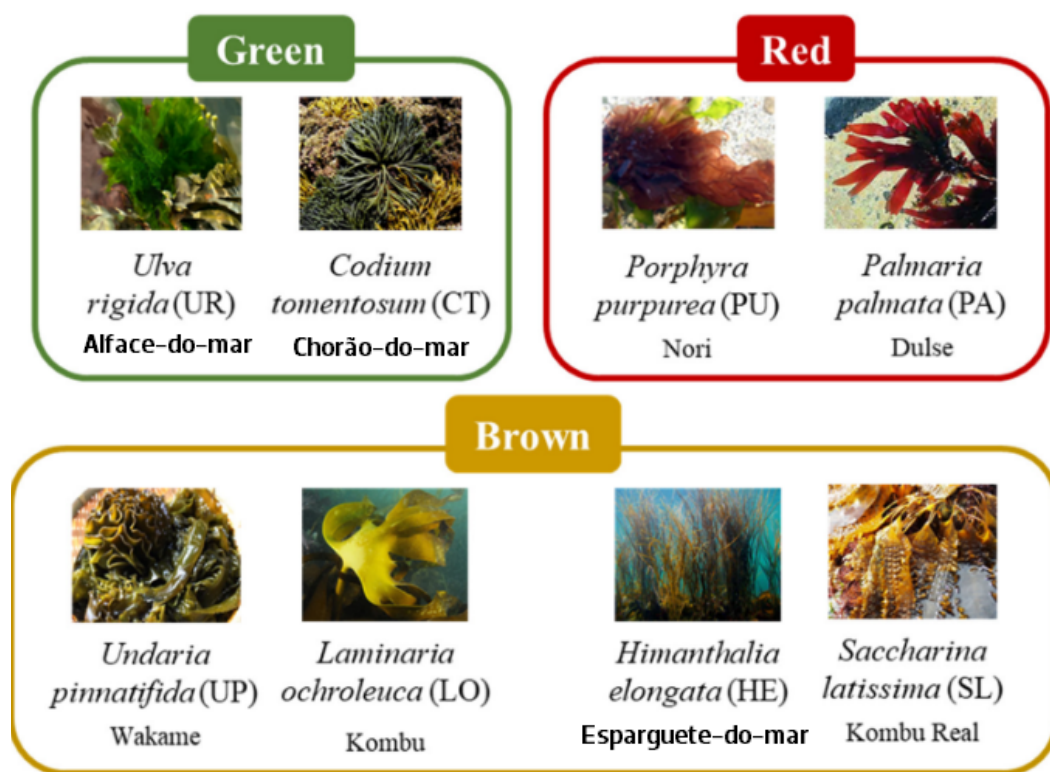


Figura 1. Exemplos de espécies de algas verdes, vermelhas e castanhas (Adaptado de Cassani et al., 2022).

a. Descrição da alga *Undaria pinnatifida*

Um exemplo de espécie de alga cultivada é a *Undaria pinnatifida*, conhecida como “Miyeok” na Coreia do Sul ou “Wakame” no Japão, sendo apreciada como alimento na China (Neri et al., 2019). Esta alga é considerada uma das piores espécies invasoras do mundo e a terceira mais perigosa das 113 macroalgas consideradas como piores (South, Floerl, Forrest, & Thomsen, 2017). Trata-se de uma alga que provém da família das algas castanhas, sendo uma grande alga pertencente à ordem das Laminariales. Normalmente, cresce nos mares do Japão e é utilizada em sopas, podendo também ser consumida a fresco em saladas, pães ou com arroz (Fung, Hamid, & Lu, 2013; Xu et al., 2017). A alga foi, primeiramente, encontrada na China, Japão e Coreia, distribuindo-se depois por mais de 12 países incluindo Espanha, Austrália, Itália, América do Norte e do Sul, Argentina e Nova Zelândia (Mak et al. 2014). Estruturalmente, a alga wakame divide-se em folha, nervura central, esporofilo e raízes/formações radiculares (Figura 2) (Fung et al., 2013; Phull & Kim, 2018).

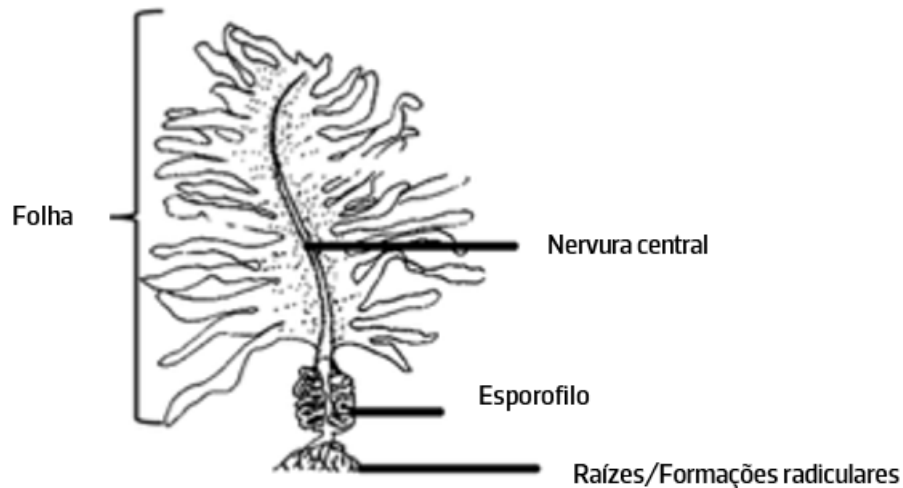


Figura 2. Estrutura da alga wakame (Adaptado de Fung et al., 2013 e Phull & Kim, 2018)

b. Composição química da alga *Undaria pinnatifida*

A alga wakame apresenta um elevado valor nutricional, contendo teores elevados de cálcio, sódio, potássio, ferro, iodo, tiamina (vitamina B₁), niacina (vitamina B₃), cobalamina (vitamina B₁₂), e proteína. É também uma importante fonte de ácido eicosapentanóico (EPA), um ácido gordo da série ômega-3, e também de polissacáridos. Quanto a estes últimos compostos, é constituída, maioritariamente, por polissacáridos sulfatados, como celulose, alginatos e fucoidano (Fung et al., 2013; Phull & Kim, 2018). No caso do fucoidano isolado da *U. pinnatifida*, os três monossacáridos mais abundantes são a manose, fucose e a galactose. Adicionalmente aos monossacáridos, também existe ácido urónico e sulfato (Figura 3) (Skriptsova et al., 2019). Taboada, Millán, & Miguez (2013) reportaram que a *U. pinnatifida* contém 37% de hidratos de carbono, 16,8% de proteína, 1% de lípidos e 16,9% de fibras.

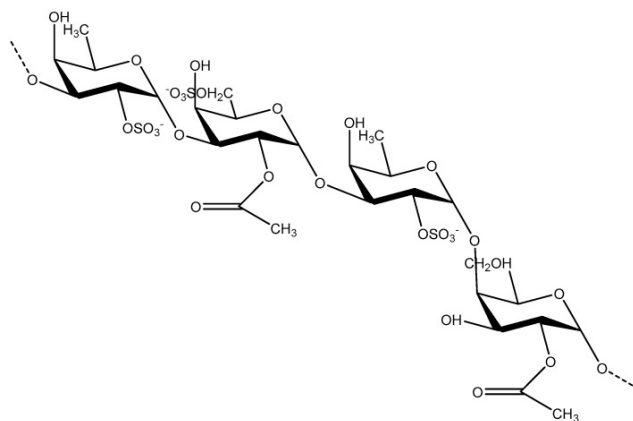


Figura 3. Estrutura básica do fucoidano isolado da *U. pinnatifida* (Zhao et al., 2018).

Um carotenoide presente na alga wakame, a fucoxantina, parece ajudar no excesso de peso/obesidade (Fung et al., 2013; Phull & Kim, 2018). A primeira vez que a fucoxantina foi isolada em 1914, foi extratída de três tipos de algas castanhas (*Dictyota*, *Fucus* e *Laminaria*). Na Alemanha a alga *U. pinnatifida* é predominantemente utilizada para a extração do composto, devido ao seu elevado teor na fração lipídica do pigmento (Billakanti et al., 2013). A fucoxantina é considerada um dos pigmentos fotossintéticos mais abundantes e característicos das algas castanhas, representando cerca de 10% do total de carotenoides existentes na natureza. O composto apresenta uma cor laranja característica e pertence à família dos carotenoides, que inclui uma classe de moléculas de 40 carbonos, que se dividem em dois grupos: os carotenos (estruturas de hidrocarbonetos puros) e as xantofilas (derivados oxigenados). A fucoxantina é uma xantofila, cuja bioatividade é atribuída ao seu cromóforo polieno, o qual contém uma ligação dupla e dois grupos hidroxilo. A fucoxantina tem uma estrutura única incluindo uma ligação dupla e 5,6-monoepóxido e resíduos hidroxilados e carboxilados, que conferem propriedades antioxidantes ao composto (Figura 4) (Lourenço-Lopes et al., 2022). O teor de fucoxantina na *U. pinnatifida* varia consoante a estação e o ciclo de vida das algas, tendo a fase madura do esporófito entre o inverno e a primavera, e a fase de senescência durante o verão, o maior teor (Fung et al., 2013). Após a administração da fucoxantina, esta é rapidamente metabolizada por enzimas digestivas (lipases e colesterol-esterases), que a transformam em fucoxantíol, por desacetilação. Parte do metabolito é depois desidrogenado/isomerizado para amarouciaxantina A no fígado. A amarouciaxantina A é armazenada no tecido adiposo branco, enquanto que o fucoxantíol entra na corrente sanguínea, podendo ser armazenado em vários órgãos (Zhang et al., 2015).

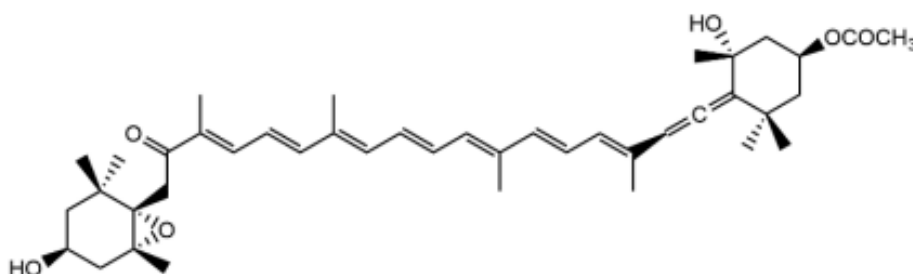


Figura 4. Estrutura química da fucoxantina (Lourenço-Lopes et al., 2022).

c. Atividades biológicas e segurança da alga *Undaria pinnatifida*

Os extratos de *U. pinnatifida* possuem várias atividades biológicas, nomeadamente, atividade antioxidante, anticancerígena, anticoagulante, anti-inflamatória, antidiabética e antimicrobiana, que estão maioritariamente relacionadas com os polissacáridos, carotenoides, tocoferóis, vitaminas, ácidos gordos e esteróis (Wang et al. 2018), assim como com os aminoácidos, péptidos e proteínas (Zhang, Pang, and Han 2014).

Por sua vez, a fucoxantina, um dos carotenoides mais abundantes na alga, possui uma estrutura única, sendo metabolizada em fucoxantanol e amarouciaxantina *in vivo* (Yang et al., 2021). Este composto possui atividade antioxidante, anticancerígena, antidiabética, antimalárica, anti-obesidade e anti-inflamatória (Fung et al., 2013). É de realçar a atividade antioxidante da fucoxantina, que parece ser superior à das vitaminas C e E. Além disso, o composto parece ter efeitos protetores ao nível hepático, cardíaco e cerebral. Como apresenta uma boa atividade antioxidante, tem também um bom desempenho contra o stress oxidativo (Chung et al., 2013; Yang et al., 2021).

Habitualmente, os locais das algas que apresentam alto teor de nutrientes são os esporofilos, assim como os caules secos, sendo bastante usados na medicina chinesa e na japonesa (Kampo) (Phull & Kim, 2018; Xu et al., 2017).

Num estudo conduzido por Kadekaru et al. (2008) avaliou-se a toxicidade da fucoxantina purificada da *U. pinnatifida*. A avaliação toxicológica foi feita após uma dose oral repetida de fucoxantina purificada (pureza $\geq 95\%$) a ratos por 28 dias. Ao 28º dia não se verificaram sinais de toxicidade. No entanto, aumentos significativos no colesterol total e na lipoproteína de alta densidade foram observados no sangue, quando a dose de fucoxantina foi de 10 mg/kg/dia ou superior. Um outro estudo realizado com ratos confirmou a segurança de doses únicas administradas por via oral de 1000 e 2000 mg/kg e doses repetidas de 500 e 1000 mg/kg administradas por 30 dias. No estudo, não se observou mortalidade ou anormalidades.

1.3.1 Atividade anticancerígena

Cerca de 19,3 milhões de novos casos de cancro e quase 10,0 milhões de mortes por cancro ocorreram em 2020. O cancro de mama ultrapassou o cancro do pulmão, como o cancro mais diagnosticado, com uma estimativa de 2,3 milhões de novos casos (11,7%), seguido do cancro do pulmão (11,4%), cancro colorretal (10,0%), cancro da próstata (7,3%) e cancro do estômago (5,6%)

(Sung et al., 2021). Desta forma, a pesquisa por compostos, nomeadamente, derivados de fontes naturais, que atuem na prevenção e tratamento do cancro, tem aumentado nos últimos anos.

A atividade anticancerígena da alga wakame tem sido estudada, ao longo do tempo, principalmente devido à fucoxantina e ao fucoídano. No caso da fucoxantina, este composto demonstrou um comportamento antiproliferativo em diferentes tipos de cancro (Kumar, Hosokawa, & Miyashita, 2013). Wang et al. (2014) testaram extratos da alga *U. pinnatifida*, da Nova Zelândia contendo fucoxantina (extratos com 0,2%, 43,5% e 60,8% do composto), em comparação com o composto puro, em diferentes linhas celulares cancerígenas humanas. Os valores de IC₅₀ do extrato bruto de *U. pinnatifida* (0,2% de fucoxantina) por 48h e 72h foram significativamente menores do que os valores de IC₅₀ correspondentes à fucoxantina pura em praticamente as linhas celulares cancerígenas. No caso das células de adenocarcinoma do cólon (Lovo), os valores de IC₅₀ do extrato bruto ($14,18 \pm 0,52 \mu\text{M}$ para 48h e $8,84 \pm 0,38 \mu\text{M}$ para 72h) foram quase três vezes menores que os valores de IC₅₀ da fucoxantina pura ($39,62 \pm 0,94 \mu\text{M}$ para 48h e $21,83 \pm 1,17 \mu\text{M}$ para 72h). Por sua vez, Hosokawa et al. (1999) demonstraram que a fucoxantina parece promover a apoptose em células de leucemia humanas. Segundo Yu et al. (2011), a fucoxantina também tem efeito indutor de apoptose em células do adenocarcinoma gástrico humano.

No caso do fucoídano, Synytsya et al. (2010) estudaram a estrutura e atividade antitumoral do composto isolado do esporófilo de algas coreanas cultivadas de *U. pinnatifida*. Este polissacárido definido como um O-acetilado sulfatado galactofucano demonstrou atividade antitumoral contra as células PC-3 (cancro da próstata), HeLa (cancro do colo do útero), A549 (cancro do pulmão), e HepG₂ (carcinoma hepatocelular), de forma semelhante ao fucoídano comercial. Por sua vez, Boo et al. (2011), demonstraram que o tratamento das células de cancro do pulmão (A549) com o fucoídano resultou numa potente atividade antiproliferativa. Além disso, algumas características de apoptose foram observadas, como por exemplo, a condensação da cromatina. Também Yang et al. (2013) relataram que o fucoídano isolado de *U. pinnatifida* demonstrou ter atividade anticancerígena em células SMMC-7721 (carcinoma hepatocelular humano) por indução de apoptose celular, através da via mitocondrial mediada por espécies reativas de oxigénio (ROS). Este efeito parece estar associado à redução da enzima glutatona reduzida, acumulação de ROS, danos a nível mitocondrial e ativação de caspases.

O tipo de fucoídano extraído pode também influenciar a sua atividade biológica. Por exemplo, o fucoídano isolado de *U. pinnatifida* exibiu uma atividade anticancerígena maior contra linhas

celulares de cancro da mama (T-47D) e melanoma (SK-MEL-28), em comparação com o fucoidano isolado de *Saccharina japonica*. Neste caso, o tipo de ligações glicosídicas podem explicar a diferença na atividade. O fucoidano da *U. pinnatifida* apresenta uma estrutura com ligações do tipo (1→3):(1→4)-*O*-glicosídicas, e no caso da *S. japonica* apresenta ligações do tipo (1→3)-*O*-glicosídicas (Vishchuk et al., 2011).

Burney et al. (2018) determinaram a atividade do fucoidano proveniente de *U. pinnatifida* quando dado em combinação com fármacos, usando modelos animais e duas linhas de cancro (cancro da mama e cancro do ovário). Este estudo confirmou que o fucoidano em combinação com o tamoxifeno não diminuiu a atividade do fármaco no cancro da mama e ovário, tendo-se observado algum potencial para melhorar a atividade em comparação com o tamoxifeno sozinho em cancros da mama. Por sua vez, investigadores estudaram o efeito da co-administração do fucoidano, derivado da *U. pinnatifida*, na farmacocinética de dois fármacos utilizados em terapias hormonais (letrozol e tamoxifeno), em pacientes com cancro da mama. A administração do fucoidano foi bem tolerada, não tendo efeito significativo nas concentrações dos fármacos (Tocaciu et al., 2018).

Outros compostos presentes na alga também têm vindo a ser estudados. Por exemplo, Wu et al. (2019) demonstraram que um polissacárido sulfatado reduziu significativamente a proliferação das células de cancro da mama (MCF7) com o aumento do tempo e da concentração, podendo estes efeitos estar relacionados com a inibição da migração, proliferação e indução da apoptose das células cancerígenas. Num outro estudo de Lee et al. (2018), os manogalactofucanos de baixo peso molecular preparados por degradação enzimática do galactofucano de alto peso molecular (proveniente da alga *U. pinnatifida*) foram avaliados quanto aos seus efeitos anticancerígenos contra o cancro de próstata humano, tendo estes compostos atenuado o crescimento das células cancerígenas *in vitro* e *in vivo*.

1.3.2. Atividade anti-hipertensora

As doenças cardiovasculares (DCV), são problemas que ameaçam a saúde humana, envolvem o coração e o sangue, e incluem o enfarte do miocárdio, doença cardíaca hipertensiva, arritmia cardíaca, acidente vascular cerebral, doença arterial periférica, trombose venosa e outras doenças (Kang et al., 2015). A prevalência de casos de DCV praticamente duplicou de 1990 para

2019, passando de 271 milhões para 523 milhões, tendo o número de mortes por DCV aumentado de 12,1 milhões em 1990 para 18,6 milhões em 2019 (Roth et al., 2020).

A redução das DCVs está relacionada com a prevenção da coagulação do sangue e a redução da hipertensão, podendo a alga *U. pinnatifida* atuar através destes mecanismos (Faggio et al., 2014, 2015; Kim et al., 2007; Min et al., 2012; Sato et al., 2002a, b; Suetsuna & Nakano, 2000; Suetsuna et al., 2004).

No seu estudo, Suetsuna & Nakano (2000) separaram e identificaram quatro tetrapéptidos de *U. pinnatifida*, tendo estudado o seu efeito na inibição da enzima conversora de angiotensina I (IECA), uma importante enzima na regulação da pressão arterial. As sequências de aminoácidos foram as seguintes: Tyr-Lys-Tyr-Tyr, Tyr-Asn-Lys-Leu, Ala-Ile-Tyr-Lys e Lys-Phe-Tyr-Gly, respetivamente. Posteriormente, cada tetrapéptido foi sintetizado e a sua atividade anti-hipertensora determinada após administração oral em ratos hipertensos, tendo-se observado uma diminuição na pressão arterial após a ingestão dos péptidos. Num outro estudo, Sato et al. (2002) isolaram sete tipos de péptidos inibidores da IECA, de hidrolisados da alga *U. pinnatifida*. A pressão arterial diminuiu em quatro dos sete péptidos (Val-Tyr, Ile-Tyr, Phe-Tyr, and Ile-Trp) na dose de 1 mg/Kg de massa corporal.

1.3.3. Atividade anticoagulante

De acordo com estudos prévios, o peso molecular do polímero de fucoidano está relacionado com a sua atividade anticoagulante (Nishino et al., 1991). Um estudo demonstrou que o fucoidano com maior atividade anticoagulante foi o que continha um peso molecular de aproximadamente 10 kDa a 300 kDa (Yang et al., 2008).

Num estudo, Kim et al. (2007) isolaram o fucoidano da alga *U. pinnatifida*. O fucoidano purificado atrasou o tempo de coagulação sanguínea em até cinco vezes mais que o controlo, e 1,5 vezes que a mesma dose do fucoidano comercial. Por sua vez, Min et al. (2012) relataram o efeito antitrombótico do fucoidano isolado da alga *U. pinnatifida*. O estudo analisou os efeitos antitrombóticos do fucoidano e da heparina, assim como os seus efeitos no sangramento, num modelo animal. Os resultados demonstraram que tanto o fucoidano, como a heparina inibiram significativamente a formação de trombos (em função da concentração), enquanto que o tempo para interromper o sangramento foi apenas prolongado no grupo tratado com heparina e não no grupo tratado com fucoidano. Num outro estudo, Faggio et al. (2014) separaram polissacáridos

de *U. pinnatifida* e investigaram a sua atividade anticoagulante. Os polissacáridos retardaram significativamente o tempo de ativação da tromboplastina parcial e da protrombina. Além disso, reduziram a produção de fibrinogénio no sangue.

As moléculas de fucoidano interferem nas vias extrínsecas e intrínsecas da coagulação inibindo a formação do coágulo, e tendo assim uma ação semelhante à heparina. Desta forma, o desenvolvimento de fármacos anticoagulantes com fucoidanos pode ser vantajoso, pois evitaria o potencial de contaminação por príons ou vírus em heparinas comerciais obtidas de intestino suíno e bovino (Zhao et al., 2018).

1.3.4. Atividade anti-inflamatória

A inflamação ocorre em resposta a estímulos nocivos ou lesões no corpo, com o objetivo de remover ou controlar o agente nocivo, ou promover a reparação do tecido lesado (Hossen et al., 2016; Srivastava et al., 2016). Sintomas como vermelhidão, inchaço, calor e dor são representativos de inflamação. Durante o processo de resposta inflamatória, várias substâncias pró-inflamatórias são libertadas por macrófagos, incluindo a prostaglandina E_2 (PGE_2), a interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a bradicinina, quimiocinas, e eicosanóides (Cheong et al., 2016; Lee et al., 2013). A cicloxigenase-2 (COX-2) e a sintase óxido nítrico indutível (iNOS) são duas enzimas pró-inflamatórias importantes que produzem uma grande quantidade de óxido nítrico (NO), resultando em várias doenças inflamatórias crônicas. Desta forma, a redução dos níveis de COX-2 e iNOS é considerada uma estratégia eficaz contra doenças inflamatórias (Lee et al., 2012a). Compostos que reduzam os níveis de COX-2 e iNOS ou atuem contra a libertação de IL-6, TNF- α e outras citocinas associadas à inflamação são considerados promissores para o desenvolvimento de agentes terapêuticos para o controlo de doenças inflamatórias.

Diferentes estudos têm demonstrado que *U. pinnatifida* possui uma forte atividade antiinflamatória (Khan et al., 2007; Li et al., 2015; Maruyama et al., 2015; Oh et al., 2016; Rafiqzaman et al., 2015; Song et al., 2015).

Khan et al. (2007) isolaram dois ácidos gordos poliinsaturados da série ómega-3, o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido estearidónico, e avaliaram as suas atividades antiinflamatórias em camundongos. O EPA foi ativo contra a inflamação da orelha de camundongo induzida por acetato de miristato de forbol. Por sua vez, o ácido estearidónico

demonstrou uma atividade mais forte do que o EPA contra o edema, eritema e fluxo sanguíneo. Num outro estudo, Rafiquzzaman et al. (2015) purificaram uma glicoproteína de *U. pinnatifida* (UPGP) e avaliaram a atividade anti-inflamatória. A UPGP inibiu a produção de NO estimulada por lipopolissacáridos (LPS) em 94,2%, numa concentração de 100 µg/mL, em células de macrófagos RAW 264.7. Além disso, a UPGP inibiu a COX-1 (ciclooxigenase-1) e COX-2 com valores de IC₅₀ de 53,03 ± 1,03 µg/mL e 193,35 ± 3,08 µg/mL, respectivamente. Por sua vez, Song et al. (2015) relataram que os polissacáridos ricos em sulfato isolados de *U. pinnatifida* demonstraram efeitos protetores contra a inflamação induzida por LPS em macrófagos RAW 264.7. A produção de NO e PGE₂ das células pré-tratadas com extrato de *U. pinnatifida* foram significativamente reduzidas em comparação com as células tratadas apenas com LPS, resultando em níveis reduzidos de expressão de iNOS e COX-2.

Ainda relativamente aos efeitos anti-inflamatórios, Maruyama et al. (2015) relataram os efeitos protetores do fucoidano isolado de *U. pinnatifida* contra a inflamação induzida pela radiação ultravioleta-B, na pele de camundongos. Os resultados indicaram efeitos supressores do fucoidano contra o edema cutâneo e a expressão da metaloproteinase 1 da matriz (MMP-1). Além disso, o fucoidano aumentou o nível de interferon gama e diminuiu o nível de TNF- α , regulando a expressão do fator nuclear kappa B (NF- κ B), um fator de transcrição com um papel importante na inflamação aguda ou crónica. Num outro estudo, Li et al. (2015) relataram que o fucosterol isolado de *U. pinnatifida* possui um efeito protetor contra a lesão pulmonar aguda induzida por LPS, possivelmente por inibição da ativação de NF- κ B, e a produção de citocinas pró-inflamatórias. O fucosterol é um dos mais abundantes esteróis presentes nas macroalgas marinhas. Por fim, Oh et al. (2016) investigaram o efeito de *U. pinnatifida* como aditivo alimentar em camundongos com uma dieta rica em gordura. A produção de IL-1 β em camundongos alimentados com alimentos ricos em gordura, misturados com pó liofilizado de *U. pinnatifida*, foi significativamente menor em comparação com os camundongos alimentados apenas com alimentos ricos em gordura.

1.3.5. Atividade antidiabética

A diabetes é uma perturbação metabólica descrita pela metabolização irregular da glicose, sendo que os sintomas comuns são polidipsia, polifagia e poliúria, podendo, assim, provocar múltiplas complicações como acidente vascular cerebral, insuficiência renal crónica, úlceras,

doenças cardíacas e danos a nível ocular. Com base na dependência de insulina, esta doença pode ser classificada em: Tipo 1 (diabetes mellitus insulino-dependente) e Tipo 2 (diabetes mellitus não insulino-dependente).

No século XXI, ocorreu um acréscimo num problema de saúde pública, isto é, mais de 90% das pessoas apresentam diabetes tipo 2 (Kang et al., 2013; Lee et al., 2012b). Os níveis de glicose quando acima do normal causam hiperglicémia, relacionando-se com doenças vasculares (Baron, 1998). Logo, é importante manter/controlar os níveis de glicose e impedir o desenvolvimento de complicações diabéticas no tratamento do diabetes.

Vários estudos têm demonstrado que a *U. pinnatifida* e os seus compostos (em particular o fucoídano e a fucoxantina) apresentam atividade antidiabética (Jung et al., 2012; Kim et al., 2012; Maeda et al., 2009). Segundo Maeda et al. (2009) os lipídios ricos em fucoxantina demonstraram atividade antidiabética em ratos com obesidade provocada por uma alimentação à base de gorduras. Desta forma, existiu uma diminuição dos níveis de glicose e insulina no sangue dos ratos alimentados com lipídios ricos em fucoxantina. Por sua vez, segundo Kim & Lee (2012), o fucoídano diminuiu acentuadamente o nível de glicose no sangue e melhorou a sensibilidade à insulina nos ratos diabéticos. Também Jung et al. (2012) estudaram a atividade antidiabética da fucoxantina, revelando que esta inibiu significativamente as atividades da aldose redutase recombinante humana, da proteína tirosina fosfatase 1B, e da aldose redutase, bem como a formação de produto final de glicação avançada.

1.3.6. Atividade antimicrobiana

Em relação à atividade antimicrobiana da alga wakame e dos seus compostos sabe-se que, a fucoxantina, em estudos *in vitro*, atua contra muitas bactérias aeróbias em concentrações baixas (10 a 250 µg/mL), mas tem uma atividade mais baixa contra bactérias anaeróbias, apresentado valores de concentração mínima inibitória (MICs) > 1000 µg/mL (Deyab et al., 2013; Karpiński & Adamczak, 2019). Num estudo, onde se avaliou o efeito antimicrobiano da fucoxantina através do método de difusão em disco e por microdiluição, a fucoxantina atuou contra 13 bactérias aeróbicas. Os valores de MIC obtidos para bactérias Gram-positivas foram entre 62,5 e 250 µg/mL, enquanto para bactérias Gram-negativas foram entre 125 a 500 µg/mL. De acordo com o método de difusão em disco, a atividade mais elevada da fucoxantina foi observada com o *Streptococcus agalactiae* (zona de inibição de crescimento de 12,2 mm), com

o *Staphylococcus epidermidis* (zona de inibição de crescimento de 11,2 mm), e com o *S. aureus* (zona de inibição de crescimento de 11,0 mm). Com o método de microdiluição os melhores valores foram observados com o *S. agalactiae* (MIC = 62,5 µg/mL) (Karpiński & Adamczak, 2019). Liu et al. (2019) investigaram a atividade antibacteriana da fucoxantina isolada da *U. pinnatifida* contra cinco agentes patogénicos, nomeadamente, *Enterococcus sp.*, *S. aureus*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus subtilis*, e *Pseudomonas aeruginosa*. A fucoxantina inibiu fortemente o crescimento de *Enterococcus sp.* (halo de inibição de 12,66 mm), *S. aureus* (halo de inibição de 21,80 mm), *S. faecalis* (halo de inibição de 25,24 mm), *B. subtilis* (halo de inibição de 25,49 mm), todos pertencendo a bactérias Gram-positivas. Além disso, o efeito inibitório da fucoxantina contra *Enterococcus sp.* e *S. faecalis* foi similar ao controlo positivo, cloranfenicol (11,64 mm e 26,23 mm, respetivamente).

No estudo de Phull et al. (2017) avaliou-se a atividade antibacteriana e antifúngica do fucoidano obtido da *U. pinnatifida* contra diferentes estirpes microbianas patogénicas através do método de difusão em disco. A maior atividade antibacteriana foi observada contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, com uma zona de inibição de $15,67 \pm 0,76$ mm (face a $24,3 \pm 0,76$ mm do controlo positivo cefixima), seguida da espécie *Micrococcus luteus* ($13,83 \pm 1,04$ mm) (face a $23,17 \pm 2,3$ mm da cefixima). A menor atividade foi observada para bactéria Gram-negativa *Salmonella typhimurium*, com zona de inibição de $8,5 \pm 0,05$ mm (face a $21,5 \pm 1,0$ mm da cefixima). O fucoidano também foi ativo contra fungos, observando-se a maior zona de inibição para *Aspergillus fumigatus* ($11,8 \pm 1,0$ mm) (face a $20,3 \pm 1,0$ mm do controlo positivo clotrimazol) seguido por *Aspergillus flavus* ($8,5 \pm 0,87$ mm) (face a $19,0 \pm 2,2$ mm do clotrimazol) (Phull et al., 2017). O mecanismo antibacteriano do fucoidano parece dever-se devido à grande quantidade de sulfato e de ácido glucurónico nos produtos de despolimerização do fucoidano. Os fucoidanos despolimerizados ligam-se às proteínas da membrana bacteriana e causam um efeito de ruptura, que induz a expressão de certos fatores apoptóticos, levando à apoptose bacteriana (Zhao et al., 2018).

1.3.7. Atividade antioxidante e hepatoprotetora

O stress oxidativo é um desequilíbrio entre as ROS (como o radical hidroxilo, o radical superóxido, e o peróxido de hidrogénio) e as defesas antioxidantes (ex: enzimas e moléculas não enzimáticas), sendo necessário a manutenção do equilíbrio (Kim et al., 2015b; Wang et al., 2017,

2018). Em concentrações baixas ou moderadas, as ROS podem ser benéficas, uma vez que estão envolvidas em vários processos fisiológicos. No entanto, quando em excesso, as ROS podem levar a danos nas macromoléculas (ex: lípidos, proteínas e ácidos nucleicos), provocando modificações e inibição da função normal das células (Ferreira, 2007; Neri et al., 2019). Em consequência, o stress oxidativo pode levar ao surgimento de algumas doenças, como as doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes, problemas hepáticos, ou cancro (Cai & Harrison, 2000; Fahn & Cohen, 1992; Ferreira, 2007; Neri et al., 2019; Oberg et al., 2004).

O controlo do stress oxidativo pode ser obtido garantindo os níveis adequados de antioxidantes, quer através da alimentação (ex: maior consumo de vegetais, leguminosas e frutos), quer evitando o consumo de tabaco e a exposição excessiva a poluentes ambientais e xenobióticos. Desta forma, a procura por antioxidantes provenientes de fontes naturais considera-se uma tendência, na esperança de tratar doenças decorrentes do stress oxidativo (Ferreira, 2007).

As algas marinhas castanhas, como a wakame, apresentam forte atividade antioxidante comparadas com as algas vermelhas e verdes. Como as algas estão frequentemente expostas a luz forte e altas concentrações de oxigénio, pode haver formação de ROS e outros agentes oxidantes. Porém, raramente ocorre danos graves nos componentes estruturais das algas, uma vez que estas fortaleceram os seus sistemas antioxidantes. Como a alga wakame contém fucoxantina, esta, na sua forma pura, é vulnerável à oxidação. Porém, é muito estável na presença de outros antioxidantes, como os polifenóis (Fung et al., 2013).

Em relação à alga *U. pinnatifida*, estudos referem que os seus constituintes ativos possuem uma forte atividade antioxidante (Patra et al., 2016). Assim, cada composto pode atuar por diferentes mecanismos de ação. Como tal, é importante utilizar diversos ensaios para avaliar a atividade antioxidante dos extratos algas.

O estudo de Phull et al. (2017) foi realizado com o objetivo de investigar os efeitos antioxidantes do fucoidano proveniente de *U. pinnatifida*. Os resultados demonstraram atividade antioxidante *in vitro*, na concentração de 500 µg/mL, no ensaio de eliminação do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (80% de inibição), no ensaio de inibição do óxido nítrico (71,83%), no ensaio de eliminação do radical hidroxilo (71,92%), e no ensaio de quelação de ferro (73,55%), sugerindo desta forma que o fucoidano parece ser um bom agente antioxidante. No estudo de Mak et al. (2013) os fucoicanos extraídos de *U. pinnatifida*, demonstraram uma forte atividade antioxidante, através dos ensaios do DPPH e da capacidade antioxidante redutora do cobre (CUPRAC). No

ensaio do DPPH, e na concentração de 1000 µg/mL, o fucoidano bruto (F0) apresentou uma atividade de eliminação do radical DPPH significativamente maior (86,80%) ($p < 0,05$), seguido pela fração 3 (F3) (68,65%), fração 2 (F2) (58,65%), fucoidano comercial (55,22%) e fração 1 (F1) (53,45%). No caso do ensaio do CUPRAC, na concentração de 2,5 mg/mL, o efeito quelante do fucoidano bruto foi significativamente maior ($p < 0,05$) do que a F1, F2, F3 e fucoidano comercial. As frações 1, 2 e 3 foram purificadas a partir do fucoidano bruto. Todas as frações purificadas continham fucose como o principal açúcar, seguido de galactose, e com a xilose, glicose e manose em menor quantidade. No entanto, a composição do açúcar variou entre os diferentes tipos de fucoidano. Por exemplo, o teor de fucose aumentou significativamente ($p < 0,001$) de F0 a F3, seguido de uma diminuição no teor de xilose. No caso dos pesos moleculares das frações, estes eram menos de metade do fucoidano bruto. Desta forma, as maiores atividades antioxidantes do extrato bruto nos dois ensaios realizados pode explicar-se pelo facto de que a purificação poderá ter levado à remoção de polifenóis, reduzindo assim a atividade antioxidante nas frações (Mak et al., 2013). Ponce et al. (2003) também afirmou que tanto o conteúdo de sulfato e o elevado peso molecular dos fucoidanos são necessários para a bioatividade.

Num outro estudo, duas frações de polissacáridos sulfatados (S1 e S2) foram isoladas com sucesso da alga *U. pinnatifida* e a sua atividade antioxidante determinada, recorrendo a diferentes ensaios (DPPH, radical superóxido, radical hidroxilo e capacidade quelante do ferro). Na concentração de 210 µg/mL, o ensaio de inibição do radical superóxido obteve valores de 82,65% e 80,02% para as frações S1, S2, respetivamente. Além disso, o efeito de inibição do radical por parte da vitamina C foi de apenas 69,2% na concentração de 200 µg/mL (Hu et al., 2010).

Para além da atividade antioxidante, a literatura tem demonstrado alguma atividade hepatoprotetora das algas, embora os estudos sejam ainda escassos. Nas doenças hepáticas, como por exemplo o carcinoma hepatocelular, a hepatite, entre outras, as ROS e espécies reativas de azoto exercem uma função essencial no início e desenvolvimento da doença (Morisco et al., 2008; Nagata et al., 2007). Devido à elevada atividade metabólica dos hepatócitos, o fígado é mais suscetível ao stress oxidativo e o principal alvo de substâncias tóxicas (Lima et al., 2006; Vidyashankar et al., 2010). Além disso, a biotransformação de certos xenobióticos pode originar espécies químicas instáveis e altamente reativas que podem reagir com biomoléculas funcionais e, assim, provocar efeitos adversos que podem resultar em distúrbios inflamatórios e fibróticos do fígado (Jaeschke et al., 2002). Uma forma de se estudar a atividade hepatoprotetora *in vitro*, é

através das células de hepatoma humano (HepG₂). Estas células são consideradas como um modelo para estudar *in vitro* o metabolismo dos xenobióticos e a toxicidade para o fígado, uma vez que mantém muitas das funções que representam os hepatócitos humanos normais (Knasmüller et al., 1998). Desta forma, são uma ferramenta importante para estudar os efeitos citoprotetores, genotóxicos e antigenotóxicos de extratos e compostos (Alía et al., 2005; Knasmüller et al., 2004; Mersch-Sundermann et al., 2004).

Por exemplo, o fucoidano tem demonstrado efeitos citoprotetores contra a hepatotoxicidade de diferentes xenobióticos, como o acetaminofeno (Hong et al., 2012) e o tetracloreto de carbono (Kang et al., 2008). Kang et al. (2008) realizaram um estudo para elucidar os efeitos do extrato de *U. pinnatifida* contendo fucoidano, na prevenção do stress oxidativo induzido por CCl₄. O tratamento com CCl₄ aumentou os níveis de glutamato-oxaloacetato transaminase (GOT), glutamato-piruvato transaminase (GPT), fosfatase alcalina, lactato desidrogenase (LDH) e de malondialdeído (MDA), e diminuiu os níveis de superóxido dismutase (SOD), catalase e glutaciona peroxidase (GPx) nos homogeneizados de fígado. O tratamento com extrato da alga contendo fucoidano em ratos por 14 dias (100 mg/kg) diminuiu os níveis de GOT (62,8%), GPT (68,5%), ALP (41,9%), LDH (72,7%) e MDA (122%), e aumentou os níveis de SOD (111,1%), CAT (15,9%) e GPx (52,6%). O fucoidano parece exercer os seus efeitos de hepatoproteção através da alteração de vias diretamente incluídas na modificação do microambiente do fígado (Figura 5).

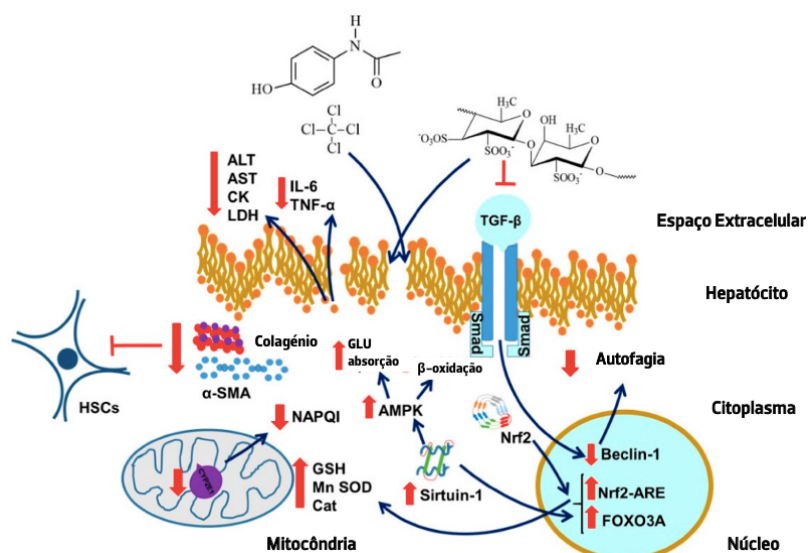


Figura 5. Efeitos do fucoidano na lesão hepática (Agentes tóxicos no lado superior esquerdo – acetaminofeno e CCl₄, e o fucoidano como agente protetor no lado superior direito). O fucoidano evita a fibrose hepática inibindo a produção de células esteladas hepáticas por meio da síntese de colágeno e α-

actina do músculo liso, e evita danos aos tecidos, reduzindo a libertação de transaminase e restaurando os potenciais antioxidantes das células. Diminui ainda a atividade do CYP2E1, que reduz os níveis de metabolitos tóxicos e inibe a via TGF- β /Smad, dificultando a ocorrência de autofagossomas. O fucoidano também estimula a expressão da sirtuína-1 no fígado, que ativa a AMPK e alivia a resistência à insulina (Adaptado de Li et al., 2016; Pan et al., 2015).

1.4. Relevância do Tema

De entre as espécies de algas da costa portuguesa, algumas podem ser utilizadas para consumo direto na alimentação humana, embora nenhuma seja atualmente colhida em larga escala e/ou comercializada para esse fim. Para além das múltiplas aplicações associadas às algas, e que se expandiram nos últimos 50 anos, tendo como base os ficocolóides (agar, carragenanas e alginatos) observa-se uma tendência para o aumento do consumo e da sua investigação também na Europa. A alga *U. pinnatifida* é também considerada uma das piores espécies invasoras. No entanto, embora possa causar algum impacto ecológico, não parece causar grandes mudanças na maioria das regiões invadidas. O facto dos seus extratos e compostos ativos isolados poderem ter vantagens em diferentes indústrias, nomeadamente a nível farmacêutico, face às várias atividades biológicas demonstradas, faz com que a sua exploração possa trazer benefícios.

Relativamente ao tema do trabalho, sabe-se que o stress oxidativo desempenha um papel central no desenvolvimento de muitas doenças, nomeadamente hepáticas, assistindo-se cada vez mais a um aumento da pesquisa de novos agentes antioxidantes capazes de reduzir o stress oxidativo e conferir hepatoproteção. Além disso, assiste-se a um uso crescente das algas como novos agentes antioxidantes e hepatoprotetores. Tendo em conta os estudos escassos com *U. pinnatifida* na atividade antioxidante e hepatoprotetora, o trabalho pretende avaliar a atividade antioxidante e hepatoprotetora de diferentes extratos da alga *U. pinnatifida*.

1.5. Objetivos

Tendo em conta os seguintes pressupostos:

- O facto de o stress oxidativo desempenhar um papel central no desenvolvimento de muitas doenças, nomeadamente hepáticas.
- O aumento da pesquisa por novos agentes antioxidantes capazes de reduzir o stress oxidativo e conferir hepatoproteção.
- A utilização crescente das algas como novos agentes antioxidantes.
- Os estudos escassos com extratos de *U. pinnatifida* e dos seus compostos ativos na avaliação da atividade antioxidante e hepatoprotetora.

O estudo apresenta como principais objetivos:

- Avaliar o efeito antioxidante *in vitro* de extratos de *U. pinnatifida*, variando diferentes condições de extração (solvente e tempo de extração).
- Determinar o teor dos compostos fenólicos e de flavonoides nos diferentes extratos de *U. pinnatifida*, nas diferentes condições de extração.
- Avaliar o potencial efeito hepatoprotetor do extrato de *U. pinnatifida* contra o stress oxidativo induzido pelo *t*-BOOH, em células hepáticas (HepG₂).

2. Material e Métodos

Trata-se de um estudo experimental, realizado no Centro de Investigação em Saúde e Ambiente (CISA) da Escola Superior de Saúde (ESS) do Instituto Politécnico do Porto (IPP), com a duração de 18 meses (início em fevereiro de 2022 e término em outubro de 2023). A parte experimental foi realizada entre outubro de 2022 e julho de 2023.

2.1. Reagentes

Os reagentes utilizados no estudo foram o DPPH, a quercetina, o *Minimum Essential Medium Eagle* (MEM), a solução de antibiótico e antimicótico a 1%, o *t*-BOOH, a curcumina, o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich, Alemanha); a ferrozina (Alfa Aesar, Kandel, Alemanha); o sulfato de ferro (FeSO₄), o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), o 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), o reagente de Folin-Ciocalteu, o ácido gálico, e o carbonato de sódio (VWR Life Science, Ohio, USA); o ácido ascórbico (Panreac, Barcelona, Espanha); e o soro fetal bovino (FBS) (Biochrom KG, Berlim, Alemanha).

2.2. Obtenção e preparação dos extratos de *U. pinnatifida*

A alga *U. pinnatifida* seca foi adquirida numa loja de produtos naturais de uma marca específica e submetida ao processo de extração para obtenção de extratos brutos. Os extratos brutos foram obtidos com dois solventes (água destilada e etanol) e diferentes técnicas extrativas. A alga seca foi reduzida a pó em moinho (da Taurus). A forma de obtenção dos extratos encontra-se resumida na Tabela 1.

Tabela 1. Extratos de *U. pinnatifida* utilizados no estudo.

Extrato	Solvente	Técnica Extrativa
EXT 1	Água destilada	Maceração: 5 g pó + 100 mL solvente (agitação, 30 min; temperatura ambiente)
EXT 2	Água destilada	Maceração: 5 g pó + 100 mL solvente (agitação, 24H; temperatura ambiente)
EXT 3	Água destilada	10 g pó + 300 mL solvente (100°C, refluxo por 3H)
EXT 4	Etanol	Maceração: 5 g pó + 10 mL solvente (agitação, 72H; temperatura ambiente)

2.2.1. Extração com água destilada como solvente

A extração com água destilada (duas macerações) realizou-se de acordo com o método descrito por Wang, Jónsdóttir, & Ólafsdóttir (2009), com algumas adaptações.

Para tal, na 1ª maceração, misturou-se 5 g de pó da alga com 100 mL de água destilada, e agitou-se, em placa de aquecimento com agitação (da VWR), por 30 minutos à temperatura ambiente. Na 2ª maceração misturou-se 5 g de pó da alga com 100 mL de água destilada, e agitou-se por 24 horas, em placa de aquecimento com agitação (da VWR), à temperatura ambiente. As soluções extrativas obtidas foram filtradas (papel de filtro Whatman, Nº.1) e posteriormente liofilizadas (LABCONCO® FreeZone series). Durante a parte experimental, o pó liofilizado foi armazenado a -20°C.

Efetou-se também uma extração utilizando água destilada e água fervente, de acordo com o método de Fujiki et al. (1992). Para tal, 10 g de pó da alga foram misturados com 300 mL de água destilada e aquecidos a 100°C, em placa de aquecimento (da VWR), com refluxo, por 3 horas. A solução extrativa obtida foi filtrada (papel de filtro Whatman, Nº.1) e posteriormente liofilizada. Durante a parte experimental, o pó liofilizado foi armazenado a -20°C.

2.2.2. Extração com etanol como solvente

Para a extração etanólica, realizou-se uma maceração, utilizando 5 g do pó das algas marinhas em 10 mL de etanol por 72 horas, com agitação em placa de aquecimento com agitação (da VWR), à temperatura ambiente. Em seguida, a solução extrativa foi filtrada (papel filtro Whatman, Nº.1) e centrifugada a 6000 x g por 10 minutos. A parte sobrenadante foi centrifugada, em alta velocidade (aproximadamente, 2000 x g por 20 minutos), para retirar os produtos insolúveis, e posteriormente concentrada em evaporador rotativo (VWR, IkaRV8) e liofilizada (LABCONCO® FreeZone series). O extrato obtido armazenou-se a 4°C até à sua utilização (Nishibori et al., 2012).

2.3. Atividade antioxidante *in vitro*

2.3.1. Ensaio do DPPH

O ensaio de DPPH realizou-se de acordo com o método descrito por Lima et al. (2007). De forma sucinta, para as concentrações a estudar (1-1000 µg/mL) dos extratos da alga *U. pinnatifida* previamente preparados, adicionou-se a solução de DPPH (90 µM). A redução do radical DPPH foi avaliada em intervalos de 5 minutos até ao fim da reação através da leitura da absorvância a 515 nm, em leitor de microplacas (Dy nex Technologies MRX II Microplate Reader). A fórmula utilizada para o cálculo da % de inibição foi a seguinte: (%) Inibição do radical DPPH = $((A_a - A_b) / A_a) \times 100$, em que A_a é a absorvância da solução de DPPH e A_b a absorvância da solução na presença da amostra/extrato. Os valores foram apresentados sob a forma de IC₅₀ (concentração de extrato correspondente a 50% da atividade captadora do radical). A quercetina foi usada como controlo positivo (Lima et al., 2007).

2.3.2. Ensaio da atividade quelante de ferro

O ensaio da atividade quelante de ferro ou ensaio de ferrozina, foi realizado de acordo com o procedimento de Russo et al. (2005), contendo algumas modificações. Assim, prepararam-se as soluções de trabalho, como a solução de FeSO₄ (0,12 mM) e uma solução ferrozina (0,06 mM). De seguida, numa microplaca de 96 poços, adicionou-se 50 µL dos extratos (1-1000 µg/mL), com 50 µL da solução de FeSO₄ e 50 µL de ferrozina. Em seguida, a microplaca foi agitada e incubada no escuro à temperatura ambiente, por 10 minutos. Após o período de incubação, leu-se a absorvância a 562 nm num leitor de microplacas (Dy nex Technologies MRX II Microplate Reader). O EDTA foi usado como controlo positivo. A capacidade dos extratos de captar o ferro foi calculada em relação ao controlo (poços apenas com ferrozina e sulfato de ferro), usando a fórmula: (%) de atividade quelante do ferro = $((AC - AS) / AC) \times 100$, em que AC é a absorvância do controlo e AS é a absorvância da amostra. A concentração de extrato correspondente a 50% da quelação do ferro (IC₅₀) foi igualmente calculada.

2.3.3. Ensaio do peróxido de hidrogénio

A capacidade dos extratos de alga eliminarem o peróxido de hidrogénio foi determinada de acordo com o método de Ruch et al., (1989). Assim, preparou-se uma solução de peróxido de hidrogénio (20 mM) em tampão fosfato (PBS; pH 7,4). Diferentes concentrações dos extratos aquosos e etanólico (1-1000 µg/mL) foram adicionadas ao peróxido de hidrogénio e a absorvância determinada a 230 nm, após 10 minutos, num leitor de microplacas (Dynex Technologies MRX II Microplate Reader). A capacidade de eliminação do peróxido de hidrogénio da amostra foi calculada da seguinte forma: Eliminação de peróxido de hidrogénio (%) = $100 \times ((AC-AS)/AC)$. Em que AC é a absorvância do controlo e AS é a absorvância da amostra. A concentração de extrato correspondente a 50% da eliminação de peróxido de hidrogénio (IC_{50}) foi igualmente calculada. Utilizou-se como controlo positivo o ácido ascórbico.

2.3.4. Ensaio do ABTS

Para o ensaio do 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) preparou-se uma solução catiónica do radical ABTS. Esta foi preparada através de uma solução ABTS (7 mM) e uma solução stock de persulfato de potássio (140 mM), e incubada ao abrigo da luz por 16 horas a 37°C. De seguida, adicionaram-se os diferentes extratos de alga à solução do radical ABTS, e incubou-se a 37°C, durante 3 minutos. Após a incubação, mediu-se a absorvância a 734 nm, num leitor de microplacas (Dynex Technologies MRX II Microplate Reader). A capacidade de eliminação do radical ABTS (em %) foi calculada através a seguinte fórmula: $100 \times ((AB - AA)/AB)$, em que AB é a absorvância do radical ABTS e AA é a absorvância do radical ABTS + extrato/controlo. O ácido ascórbico foi usado como controlo (Lee et al., 2022).

2.4. Determinação de compostos fenólicos

O teor de compostos fenólicos foi determinado por espectrofotometria de acordo com o procedimento de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton & Rossi (1965) e com algumas adaptações (Alves et al., 2010). Para o procedimento, preparou-se várias concentrações de ácido gálico (5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L, partindo de uma solução stock de 1mg/mL), que foram utilizadas para traçar a reta padrão. Mais duas soluções de trabalho foram preparadas, a de carbonato de sódio (7,5%) e o reagente de Folin na proporção de 1:10 (V/V). Para o ensaio,

misturou-se 250 µL dos extratos diluídos (0,5 mg/mL) com 1,25 mL do reagente de Folin e 1 mL de carbonato de sódio. Seguidamente, as misturas foram incubadas por 15 minutos a 45°C, e posteriormente por mais 30 minutos à temperatura ambiente. A absorvância foi lida a 765 nm. A curva de calibração para o controlo ácido gálico foi usada para obter a correlação entre a absorvância das amostras e a concentração do controlo (intervalo de linearidade = 5-100 mg/mL, $R^2 = 0,999$). O teor de compostos fenólicos foi calculado em equivalentes de ácido gálico.

2.5. Determinação do teor de flavonoides

Para a determinação do teor de flavonoides, empregou-se um método colorimétrico descrito por Eberhardt et al. (2002) e Jia et al. (1999). Assim a 0,25 mL da amostra diluída foram adicionados 75 µL de uma solução de NaNO_2 (5%), 0,150 mL de uma solução de AlCl_3 (10%) e 0,5 mL de uma solução de NaOH (1 M). Em seguida, ocorreu um ajuste de volume para 2,5 mL, com água destilada. Por último, a preparação ficou em repouso por 5 minutos. A absorvância foi medida a 510 nm. A quantidade de flavonoides foi expressa em equivalentes de quercetina (QE) por grama de extrato seco através da curva de calibração. A curva de calibração foi realizada com concentrações 20-250 mg/mL, tendo-se obtido um $R^2 = 0,9982$.

2.6. Cultura Celular

A linha celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG₂) obteve-se da *American Type Culture Collection* (ATCC) e cultivou-se em frascos de poliestireno de 25 cm² com meio MEM. Este meio MEM tinha 10% de FBS e completou-se com a solução antibiótico-antimicótica a 1%.

2.6.1. Toxicidade Celular

Na toxicidade celular e nos ensaios hepatoprotetores, as células HepG₂ foram plaqueadas em microplacas com 96 poços, com uma densidade celular de $2,5 \times 10^5$ células por poço (100 µL/poço). Para determinar a concentração e tempo a utilizar nos ensaios com o *t*-BOOH, este foi testado a 1,0 mM, a 2,5 mM e 5,0 mM. A viabilidade celular avaliou-se pelo ensaio colorimétrico MTT (Lima et al., 2006; Lima et al., 2007; Mosmann, 1983).

Numa primeira parte foi, então, avaliada a citotoxicidade dos extratos de algas. Para tal, após 48h de plaqueamento das células HepG₂, na densidade celular mais adequada, os extratos foram adicionados ao meio de cultura (variando a concentração entre 1 e 1000 µg/mL). Após 24h e 48h, a citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT. Os resultados foram demonstrados sob a forma de percentagem de viabilidade celular (comparando com a viabilidade celular do controlo). As concentrações que não demonstraram citotoxicidade foram utilizadas para a avaliação da hepatoproteção (Lima et al., 2006; Lima et al., 2007; Mosmann, 1983).

2.6.2. Proteção de extratos contra a toxicidade induzida por *t*-BOOH em células HepG₂

Para avaliar a proteção dos extratos de algas preparados previamente, contra a toxicidade induzida por *t*-BOOH em células cancerígenas de fígado, recorreu-se a um ensaio de pré-incubação (Lima et al., 2006). Neste ensaio, inicialmente os extratos de algas foram incubados por 4h com as células, seguido por um período de recuperação de 16 horas, com meio de cultura fresco sem extratos. Por fim, o *t*-BOOH foi exposto por 4 h. A curcumina foi usada como controlo positivo para o ensaio de pré-incubação. Posteriormente a viabilidade celular (em %) foi calculada através do ensaio de MTT (Lima et al., 2006).

2.7. Análise estatística

Os dados são expressos em valores médios ± desvio-padrão, de pelo menos três ensaios independentes. A análise estatística é feita pelo teste ANOVA e pelo teste de comparação múltipla de Dunnett, usando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os valores de $p \leq 0,05$ são considerados estatisticamente significativos, e o IC₅₀ é calculado a partir das curvas dose-resposta obtidas por meio do gráfico da percentagem de inibição *versus* concentrações.

3. Resultados

A utilização de extratos com diferentes solventes e técnicas extrativas permitiu a obtenção de diferentes rendimentos da alga wakame (Tabela 2). Os resultados mostraram que o rendimento variou entre 6,5% para o extrato 4 (solvente etanol) e 10,3% para o extrato 3 (solvente água, a 100°C).

Tabela 2. Rendimento das extrações efetuadas com a alga *U. pinnatifida*.

Extratos	Rendimento (%)			
	EXT 1	EXT 2	EXT 3	EXT 4
<i>U. pinnatifida</i>	7,6%	8,4%	10,3%	6,5%

EXT 1 - Maceração em água destilada à temperatura ambiente com 30 minutos de agitação; EXT 2 - Maceração em água destilada à temperatura ambiente com 24 horas de agitação; EXT 3 - Extração com água destilada, à temperatura de 100°C, durante 3 horas; EXT 4 - Maceração com etanol à temperatura ambiente com 72 horas de agitação.

3.1. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante dos diversos extratos da alga *U. pinnatifida* foi avaliada através de quatro ensaios, nomeadamente o ensaio do DPPH, o ensaio da atividade quelante do ferro (também designado de ensaio da ferrozina), o ensaio do peróxido de hidrogénio e o ensaio do radical ABTS. Assim, as tabelas seguintes evidenciam os resultados, expressos em IC₅₀, para os ensaios descritos anteriormente (Tabela 3, 4, 5 e 6).

3.1.1. Avaliação do ensaio do DPPH

Após análise dos dados apresentados, em relação ao ensaio do DPPH é possível verificar que no caso do extrato 1 não foi possível determinar o valor de IC₅₀ para as concentrações estudadas (1-1000 µg/mL). Por sua vez, o extrato 4 foi o que apresentou um menor valor de IC₅₀ (46,8 ± 1,8 µg/mL) estatisticamente significativo em relação aos restantes extratos e, desta forma, melhor atividade antioxidante. De realçar ainda que todos os extratos demonstraram uma atividade antioxidante inferior ao controlo positivo, a quercetina (IC₅₀ = 1,8 ± 0,2 µg/mL) (Tabela 3).

Tabela 3. Resultados do ensaio de DPPH, *in vitro*, nos diferentes extratos na alga *U. pinnatifida*.

Ensaio da DPPH (IC ₅₀ , µg/mL)					
Extrato	EXT 1	EXT 2	EXT 3	EXT 4	Quercetina
<i>U. pinnatifida</i>	ND	66,3 ± 1,1 ^{a,#}	51,8 ± 1,4 ^{a,#}	46,8 ± 1,8 ^{a,#}	1,8 ± 0,2 [#]

ND: Não Determinado; EXT 1: Maceração à temperatura ambiente com 30 minutos de agitação; EXT 2: Maceração à temperatura ambiente com 24 horas de agitação; EXT 3: Extração com temperatura de 100°C, durante 3 horas; EXT 4: Maceração à temperatura ambiente com 72 horas de agitação. Os valores de IC₅₀ (µg/mL) foram apresentados como média ± desvio padrão de cinco ensaios independentes (n=3). As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre extratos representam-se pelas mesmas letras; # significativamente diferente em comparação ao controlo ($p \leq 0,05$). A quercetina foi utilizada como controlo positivo.

3.1.2. Avaliação do ensaio da atividade quelante do ferro

Em relação ao ensaio da ferrozina, os extratos 1 e 2 não permitiram a determinação de IC₅₀ no intervalo de concentrações estudadas (1-1000 µg/mL). Neste ensaio, observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o EXT 3 e EXT 4, com o EXT 3 a demonstrar uma melhor atividade antioxidante, face aos restantes (IC₅₀ = 66,7 ± 2,4 µg/mL) (Tabela 4).

Tabela 4. Resultados do ensaio da ferrozina, *in vitro*, nos diferentes extratos na alga *U. pinnatifida*.

Ensaio da Ferrozina (IC ₅₀ , µg/mL)					
Extrato	EXT 1	EXT 2	EXT 3	EXT 4	EDTA
<i>U. pinnatifida</i>	ND	ND	66,7 ± 2,4 ^{a,#}	427,9 ± 75,8 ^{a,#}	1,2 ± 0,0 [#]

ND: Não Determinado; EXT 1: Maceração à temperatura ambiente com 30 minutos de agitação; EXT 2: Maceração à temperatura ambiente com 24 horas de agitação; EXT 3: Extração com temperatura de 100°C, durante 3 horas; EXT 4: Maceração à temperatura ambiente com 72 horas de agitação. Os valores de IC₅₀ (µg/mL) foram apresentados como média ± desvio padrão de cinco ensaios independentes (n=5). As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre extratos representam-se pelas mesmas letras; # significativamente diferente em comparação ao controlo ($p \leq 0,05$). O EDTA foi utilizado como controlo positivo.

3.1.3. Avaliação do ensaio do peróxido de hidrogénio

No ensaio do peróxido de hidrogénio os extratos com melhores resultados foram o extrato 3 (IC₅₀ = 22,0 ± 1,7 µg/mL) e o extrato 4 (IC₅₀ = 4,8 ± 0,2 µg/mL). No caso do extrato 4, o valor de IC₅₀ foi inferior ao do controlo positivo, o ácido ascórbico (IC₅₀ = 10,0 ± 0,1 µg/mL), embora sem diferenças significativas entre os valores (Tabela 5).

Tabela 5. Resultados do ensaio do peróxido de hidrogénio, *in vitro*, nos diferentes extratos na alga *U. pinnatifida*.

Ensaio do H ₂ O ₂ (IC ₅₀ , µg/mL)					
Extrato	EXT 1	EXT 2	EXT 3	EXT 4	AA
<i>U. pinnatifida</i>	89,9 ± 1,7 ^{c,d,#}	91,5 ± 3,2 ^{c,d,#}	22,0 ± 1,70 ^{a,b,c,#}	4,8 ± 0,2 ^{a,b,c}	10,0 ± 0,1 [#]

ND: Não Determinado; EXT 1: Maceração à temperatura ambiente com 30 minutos de agitação; EXT 2: Maceração à temperatura ambiente com 24 horas de agitação; EXT 3: Extração com temperatura de 100°C, durante 3 horas; EXT 4: Maceração à temperatura ambiente com 72 horas de agitação; AA: ácido ascórbico. Os valores de IC₅₀ (µg/mL) foram apresentados como média ± desvio padrão de cinco ensaios independentes (n=5); # significativamente diferente em comparação ao controlo ($p \leq 0,05$); ^a significativamente diferente em comparação com o EXT1; ^b significativamente diferente em comparação com o EXT2; ^c significativamente diferente em comparação com o EXT3; ^d significativamente diferente em comparação com o EXT4. O ácido ascórbico (AA) foi utilizado como controlo positivo.

3.1.4. Avaliação do ensaio do ABTS

Para o ensaio do ABTS não foi possível determinar os valores de IC₅₀ para as concentrações testadas (1- 1000 µg/mL) (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados do ensaio do ABTS, *in vitro*, nos diferentes extratos na alga *U. pinnatifida*.

Ensaio do ABTS (IC ₅₀ , µg/mL)					
Extrato	EXT 1	EXT 2	EXT 3	EXT 4	AA
<i>U. pinnatifida</i>	ND	ND	ND	ND	1,6 ± 0,2

ND: Não Determinado; EXT 1: Maceração à temperatura ambiente com 30 minutos de agitação; EXT 2: Maceração à temperatura ambiente com 24 horas de agitação; EXT 3: Extração com temperatura de 100°C, durante 3 horas; EXT 4: Maceração à temperatura ambiente com 72 horas de agitação; AA: ácido ascórbico. Os valores de IC₅₀ (µg/mL) foram apresentados como média ± desvio padrão de cinco ensaios independentes (n = 5). As diferenças significativas ($p \leq 0,05$) entre extratos representam-se pelas mesmas letras; # significativamente diferente em comparação ao controlo ($p \leq 0,05$). O ácido ascórbico (AA) foi utilizado como controlo positivo.

3.2. Teor Total de Compostos Fenólicos

Em relação à determinação do teor total de compostos fenólicos presentes nos extratos, os valores variaram entre 13,4 ± 0,0 mg GAE/g para o EXT 1 (extração feita com água destilada), e 29,4 ± 0,0 mg GAE/g, para o EXT 4 (extração feita com etanol) (Tabela 7). O EXT 4 apresentou o melhor teor de compostos fenólicos, estatisticamente significativo em relação aos restantes extratos.

Tabela 7. Teor de compostos fenólicos totais dos extratos na *U. pinnatifida*.

Extratos	Teor de compostos fenólicos totais (mg GAE/g)			
	EXT 1	EXT 2	EXT 3	EXT 4
<i>U. pinnatifida</i>	13,4 ± 0,0 ^a	15,4 ± 1,7 ^a	14,9 ± 1,1 ^a	29,4 ± 0,0

EXT 1: Maceração à temperatura ambiente com 30 minutos de agitação; EXT 2: Maceração à temperatura ambiente com 24 horas de agitação; EXT 3: Extração com temperatura de 100°C, durante 3 horas; EXT 4: Maceração à temperatura ambiente com 72 horas de agitação.; GAE: equivalentes de ácido gálico. Os resultados são expressos em mg GAE por grama de extrato seco, e os valores apresentam-se como média ± desvio padrão de quatro ensaios independentes (n=4). ^a significativamente diferente em comparação com o EXT4 ($p \leq 0,05$).

3.3. Teor Total de Flavonoides

Em relação à determinação do teor total de flavonoides presentes nos extratos, os teores foram apenas obtidos para os extratos 3 e 4, tendo variado entre 2,4 ± 0,1 mg QE/g e 2,8 ± 0,3 mg QE/g, respetivamente (Tabela 8), e sem diferenças significativas entre eles.

Tabela 8. Teor de flavonoides dos extratos na *U. pinnatifida*.

Extratos	Teor de flavonoides (mg QE/g)			
	EXT 1	EXT 2	EXT 3	EXT 4
<i>U. pinnatifida</i>	ND	ND	2,4 ± 0,1	2,8 ± 0,3

EXT 1: Maceração à temperatura ambiente com 30 minutos de agitação; EXT 2: Maceração à temperatura ambiente com 24 horas de agitação; EXT 3: Extração com temperatura de 100°C, durante 3 horas; EXT 4: Maceração à temperatura ambiente com 72 horas de agitação.; QE: equivalentes de quercetina. Os resultados são expressos em mg QE por grama de extrato seco, e os valores apresentam-se como média ± desvio padrão de quatro ensaios independentes (n=4). As diferenças entre os extratos ($p \leq 0,05$) estão representadas com letras diferentes.

3.4. Proteção de extratos contra a toxicidade induzida por t-BOOH em células HepG₂

Para o estudo do efeito hepatoprotetor utilizou-se o extrato com melhores resultados nos ensaios prévios antioxidantes e com maior teor de compostos fenólicos e flavonoides, ou seja, o extrato etanólico (EXT 4). O EXT 4 obteve uma melhor atividade antioxidante no ensaio do DPPH e do peróxido de hidrogénio. Este extrato obteve ainda o maior teor de compostos fenólicos e de flavonoides.

Inicialmente, avaliou-se a toxicidade das células HepG₂ face ao extrato (às 24h e 48h), de forma a selecionar o intervalo de concentrações não citotóxicas a utilizar no ensaio de proteção. A figura 6 evidencia os resultados obtidos, em que o tratamento das células HepG₂ com o EXT 4 (1 – 1000 µg/mL) resultou em viabilidades celulares entre 29,4% e 99,3% para as 24H, e entre

27,2% e 81,3% para as 48h. Desta forma, para os ensaios seguintes utilizou-se o intervalo de concentrações entre 1 – 500 µg/mL (com valores acima dos 50% de viabilidade celular).

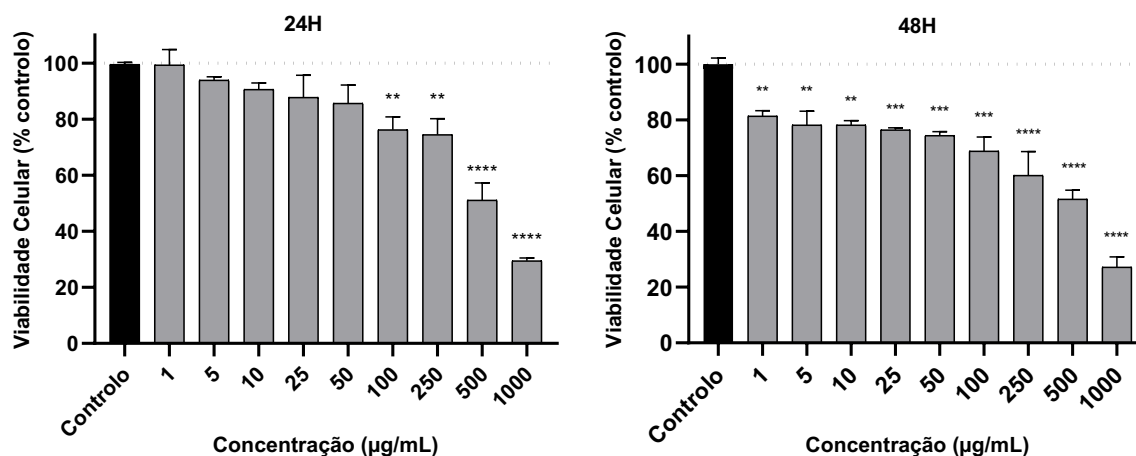


Figura 6. Citotoxicidade nas células HepG₂ de diferentes concentrações do extrato etanólico de *U. pinnatifida* ao fim de 24h e 48h. Os valores representam a média ± desvio padrão de três ensaios independentes (n = 3). As diferenças significativas (*) são relativas ao controlo ($p < 0,05$).

Posteriormente realizou-se um ensaio para determinar a concentração e o tempo do tóxico (*t*-BOOH) a utilizar no ensaio de pré-incubação. O tratamento com 5 mM por 4h resultou em 51,2% de viabilidade celular, sendo essa a concentração e tempo utilizados no ensaio seguinte (Figura 7).

De seguida realizou-se o ensaio de pré-incubação. Para tal, as células HepG₂ foram inicialmente incubadas apenas com extrato etanólico de *U. pinnatifida* por 4h. Após esse tempo, retirou-se o meio antigo e colocou-se meio fresco por 16h. Após o período de recuperação de 16h, as células foram incubadas com *t*-BOOH (por 4h e na concentração de 5 mM), de forma a refletir a capacidade dos extratos induzirem defesas antioxidantes endógenas. De seguida determinou-se a viabilidade celular, em relação ao tóxico. Os resultados encontram-se descrito na Figura 8.

Como é possível observar pela Figura 8, o tratamento prévio das células com o extrato etanólico nas concentrações de 1 e 5 µg/mL exibiram uma proteção estatisticamente significativa em relação à citotoxicidade induzida pelo tóxico (69,3% e 67,9%, respetivamente, face a uma viabilidade celular do tóxico de 51,4%). Além disso, observou-se que com o aumento da concentração dos extratos a proteção reduziu, provavelmente devido a alguns efeitos tóxicos.

De uma forma geral, é possível observar a potencial capacidade para este extrato induzir defesas antioxidantes celulares.

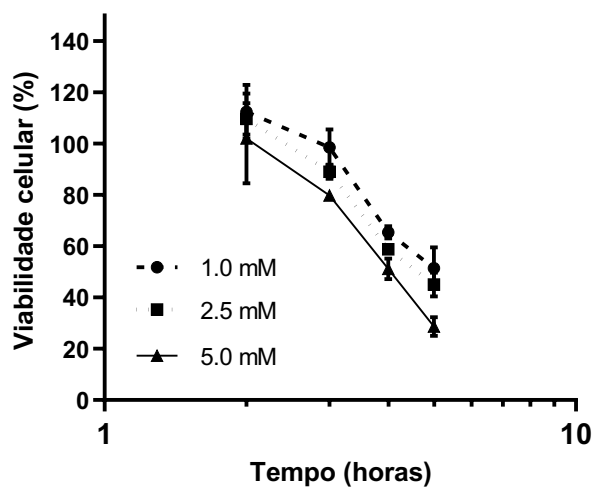


Figura 7. Toxicidade nas células HepG₂ induzida pelo *t*-BOOH após incubação do tóxico na concentração de 1 mM, 2,5 mM e 5 mM, por diferentes tempos. Os dados representam a média ± desvio padrão de três ensaios independentes.

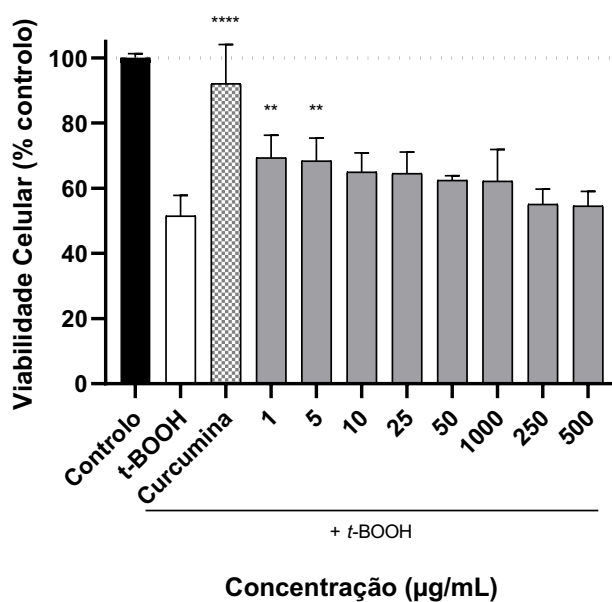


Figura 8. Proteção do extrato etanólico de alga *U. pinnatifida* nas células HepG₂. As células HepG₂ foram tratadas ou não (controlo) com *t*-BOOH (5 mM) por 4 horas (pré-incubação). A viabilidade celular foi medida pelo ensaio de MTT. Os dados consistem na média ± desvio padrão (n = 4). ** p < 0,01 e **** p < 0,0001 indica que são estatisticamente significativos relativamente ao tratamento com o tóxico (*t*-BOOH). A curcumina utilizou-se como controlo positivo.

4. Discussão

As algas marinhas são constituídas por diferentes compostos, tais como, polissacáridos, péptidos, proteínas, ácidos gordos, polifenóis, carotenoides, tocoferóis e fitoesteróis. Estes compostos têm sido utilizados para diferentes fins, tais como na alimentação, na cosmética e na medicina. Assim, as algas mais importantes e conhecidas são a *Euchema*, *Laminaria* spp., *Gracilarias* spp., *Kappaphycus* spp., *Porphyras* spp., e a *Undaria pinnatifida* (Quitério, Grosso, Ferraz, Delerue-Matos, & Soares, 2022).

Os compostos extraídos são influenciados por fatores abióticos (habitat, estação do ano, temperatura da água, época de colheita e método de processamento) e bióticos (tamanho da alga, o estágio reprodutivo e as espécies de algas marinhas). Desta forma, o rendimento e a composição do extrato poderão ser influenciados pelas diferentes condições de extração (ex: solvente utilizado, proporção sólido: líquido, o tempo de extração e a temperatura). Em relação ao tipo de solventes, são vários os que podem ser utilizados na extração, como a água e solventes orgânicos (ex: metanol, etanol, hexano, clorofórmio e acetona) (Lee et al., 2022; Quitério et al., 2022). A seleção do solvente pode depender da polaridade dos compostos a extrair. Em estudos com algas, têm surgido bons resultados de rendimentos com extratos etanólicos, sendo que, segundo Garcia-Perez et al., 2022, a alga *U. pinnatifida* teve o maior rendimento (38,8%), comparando com outras algas como a *Bifurcaria bifurcata* e *Himanthalia elongata*, com valores de 24 e 27%, respetivamente. Estes resultados podem justificar-se com a composição da alga *U. pinnatifida*, uma vez que contém diversos constituintes polares, como uma grande quantidade de polissacáridos, de proteínas, de minerais e de lípidos. O etanol tem-se revelado um dos solventes mais eficazes para a extração com algas marinhas, porque dissolve compostos heterogéneos, ou seja, extrai os compostos polares (proteínas e derivados) e atua como agente precipitante de polissacarídeos (o maior constituinte químico das algas), prevenindo, assim, a presença de intromissões na determinação analítica. Por sua vez, a extração com água é o método de extração mais simples e viável para implementar numa escala industrial, mas ainda há muito a ser estudado quanto às condições ideais de extração com este solvente (Ferreira et al., 2019).

Num estudo de Lee et al. (2022) a extração foi feita com diferentes partes da *U. pinnatifida*, utilizando diferentes solventes, como o etanol (95%), metanol (95%) e água quente. Considerando todas as partes da alga, o maior valor de rendimento de extração foi obtido com água quente (4,5-35,6%), em comparação com etanol (0,7-2,3%) e metanol (1,5-9,2%). Analisando as diferentes partes da alga, a alga completa sujeita a uma extração com água quente

foi a que demonstrou o maior rendimento (35,6%). Num outro estudo de Hwang & Thi (2014), com algas vermelhas (*Porphyra tenera*) preparadas de três formas distintas (secas, torradas e temperadas usualmente com óleo de sésamo e sal), comprovou-se que a extração com água a 100°C teve maior rendimento que a extração com água a 37°C, ou com etanol (70%). No caso da extração com água, o rendimento obtido foi de 26,4% para a alga temperada, 40,6% para a alga torrada e 41,3% para a alga seca. Estes resultados vão de encontro aos deste trabalho, uma vez que o EXT 3 (extração utilizando água destilada a 100°C) foi o que demonstrou um maior rendimento (10,3%). Desta forma, os resultados parecem sugerir que o solvente utilizado na extração pode influenciar a eficácia do processo. Além disso, os resultados também nos indicam que grande parte dos compostos solúveis nas algas têm elevada polaridade, o que é esperado uma vez que as macroalgas são ricas em polissacáridos (Lee et al., 2022).

As algas marinhas são importantes fontes de agentes antioxidantes polifenólicos, como flavonóis, catequinas e florotaninas (Heo et al., 2005). O teor destes compostos pode variar consoante o habitat das algas, o tempo de colheita, e a polaridade dos solventes de extração (Aminina et al., 2020; Rodríguez-Bernaldo de Quirós et al., 2010). Diferenças significativas no teor total de compostos fenólicos e flavonoides foram encontradas entre os extratos estudados. No presente estudo, com a alga wakame, o teor de compostos fenólicos variou entre $13,4 \pm 0,0$ mg GAE/g e $29,4 \pm 0,0$ mg GAE/g, enquanto o teor de flavonoides variou entre $2,4 \pm 0,1$ mg QE/g e $2,8 \pm 0,3$ mg QE/g, dependendo do solvente e técnica extrativa. Os maiores valores foram encontrados para o extrato 4 (etanólico). Sabe-se que a solubilidade de compostos fenólicos é geralmente elevada com solventes polares, comparativamente com a água (Hwang & Thi, 2014).

No estudo de Pedro et al. (2021) diferentes extratos de *U. pinnatifida* foram preparados utilizando três métodos diferentes: (1) fervura em água depois de lavado; (2) extração com água à temperatura ambiente; e (3) seco e tratado com enzimas digestivas. Como resultado, o extrato seco tratado com enzimas digestivas originou um extrato com maior teor de compostos fenólicos relativamente aos outros extratos de *U. pinnatifida* ($17,89 \pm 0,44$ µg GAE/mg extrato). No caso da alga fervida e com extração à temperatura ambiente, os teores de compostos fenólicos totais foram de $2,36 \pm 0,12$ µg GAE/mg extrato e $3,02 \pm 0,16$ µg GAE/mg extrato, respetivamente. Por sua vez, no estudo de Lee et al. (2022), entre os solventes utilizados nas diferentes partes da alga *U. pinnatifida*, os extratos metanólicos exibiram o teor de polifenóis mais elevado, seguido do etanol e a água quente. Dentro dos extratos etanólicos o extrato de esporófilos de *U. pinnatifida* obteve o maior teor de polifenóis totais ($2,53 \pm 0,02$ mg ácido tânico/g).

Para além da influência do solvente e da técnica extrativa, a espécie de alga também pode influenciar o conteúdo de compostos fenólicos. Por exemplo, no estudo de Kuda et al. (2005) o teor de compostos fenólicos do extrato etanólico da alga castanha *Papenfussiella kuromo*, foi de apenas 0,18 mg GAE/g. Também no seu estudo, He et al. (2022) extraíram os polifenóis de três espécies de algas (*Sargassum miyabei*, *U. pinnatifida suringar*, e *Sargassum thunbergii*), avaliando ainda a sua atividade antioxidante. Observou-se um maior teor de polifenóis na *S. thunbergii* (34,99 mg), comparativamente à *S. miyabei* (23,26 mg) e à *U. pinnatifida suringar* (25,34 mg). A atividade antioxidante dos polifenóis extraídos das três espécies de algas foi maior nos polifenóis extraídos de *U. pinnatifida suringar*. No ensaio do DPPH, os polifenóis extraídos de *U. pinnatifida suringar* e *S. thunbergii* apresentaram o maior valor de percentagem de inibição do radical DPPH (92,95%) e o menor valor (39,31%), respetivamente.

Os compostos antioxidantes podem ser classificados como antioxidantes primários e antioxidantes secundários ou preventivos. Aqueles compostos que atuam principalmente como doadores de átomos de hidrogénio aos radicais livres são classificados como antioxidantes primários. Os antioxidantes secundários atuam por vários mecanismos, como eliminação de oxigénio reativo, fornecimento de um átomo de hidrogénio a um antioxidante primário e decomposição de H_2O_2 (Berdahl et al., 2010).

Na avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, foram utilizados quatro ensaios, nomeadamente, o ensaio do DPPH, ensaio da ferrozina, ensaio do H_2O_2 e ensaio do radical ABTS, em extratos aquosos e etanólicos. Segundo Kuete & Efferth (2010), a atividade antioxidante pode ser classificado de alta, moderada ou baixa, de acordo com o valor de IC_{50} . Assim, se $IC_{50} < 50 \mu g/mL$, significa que a capacidade antioxidante é alta ou significativa; se $50 \mu g/mL < IC_{50} \leq 100 \mu g/mL$, significa que a capacidade antioxidante é moderada; e se $IC_{50} > 100 \mu g/mL$, significa que a capacidade antioxidante é baixa (Kuete & Efferth, 2010). Também Omisore et al. (2005) consideraram como ponto de corte para a atividade antioxidante o valor de IC_{50} de $50 \mu g/mL$. Assim, com valores de $IC_{50} > 50 \mu g/mL$, os extratos são classificados como tendo uma atividade antioxidante moderada, se os valores de $IC_{50} < 50 \mu g/mL$, o extrato é classificado como tendo uma alta atividade antioxidante (Omisore et al., 2005).

Neste trabalho, foi possível observar alguns extratos com elevada atividade antioxidante, nomeadamente, o EXT 4 no ensaio do DPPH ($IC_{50} = 46,8 \pm 1,8 \mu g/mL$); no ensaio do peróxido de hidrogénio ($IC_{50} = 4,28 \pm 0,19 \mu g/mL$); e o EXT 3, também no ensaio do peróxido de hidrogénio ($IC_{50} = 22,0 \pm 1,7 \mu g/mL$).

O ensaio do DPPH é geralmente usado como substrato para avaliar a atividade antioxidante. O método baseia-se na redução de uma solução etanólica de DPPH na presença de um antioxidante dador de hidrogénio, resultando na formação da forma não radicalar DPPH-H. No ensaio, os valores de IC₅₀ foram menores no EXT 4 (etanólico) (IC₅₀ = 46,8 ± 1,8 µg/mL). Já os extratos com água destilada demonstraram uma menor atividade de inibição do radical DPPH. Estes resultados vão de encontro aos encontrados por Hwang & Thi (2014), onde se demonstrou que ambos os extratos aquosos obtiveram menor atividade de inibição de radicais DPPH, comparativamente com o extrato etanólico (70% a 37°C). A extração com elevada temperatura (ou seja, 100°C) pode destruir alguns compostos bioativos e diminuir a inibição dos radicais de DPPH. Também no estudo de Lee et al. (2022), os extratos com metanol e etanol apresentaram melhores valores no ensaio do DPPH, sendo que a *U. pinnatifida* apresentou maior atividade de inibição do DPPH (IC₅₀ = 17,42 ± 1,29 mg/mL), comparativamente com extratos etanólicos diferentes. No entanto, neste trabalho, o EXT 3 (água destilada, 100°C) obteve um valor de IC₅₀ < 50 µg/mL, mas muito próximo do extrato etanólico (51,8 ± 1,4 µg/mL). No seu estudo, Pedro et al. (2021) também obtiveram melhores resultados no ensaio do DPPH, para o extrato obtido com água destilada (água fervente). Uma explicação para este resultado poderá ter a ver com a presença de outros compostos antioxidantes na alga marinha *U. pinnatifida*, como por exemplo a fucoxantina, a qual poderá sofrer uma melhor extração a 100 °C, contribuindo deste modo para uma atividade antioxidante moderada no ensaio do DPPH.

A atividade quelante de ferro é baseada na medição da absorvância do complexo ferro (II)-ferrozina. Este complexo produziu um cromóforo vermelho com absorvância máxima em 562 nm. Os agentes quelantes são capazes de capturar iões ferrosos antes da ferrozina. O efeito antioxidante a nível da quelação de iões ferro é importante e está relacionado com o facto do cobre e ferro poderem promover o dano oxidativo a diferentes níveis, por exemplo estimulando a peroxidação lipídica (Saiga et al., 2003; Yamauchi et al., 1988). Neste estudo, os valores de IC₅₀ foram menores no EXT 3 (extração com temperatura a 100°C, durante 3 horas) (IC₅₀ = 66,7 ± 2,4 µg/mL). Nos restantes extratos aquosos não foi possível a determinação da atividade quelante do ferro. Já no extrato etanólico, o valor do IC₅₀ o mais elevado, acima dos 100 µg/mL (IC₅₀ = 427,9 ± 75,8 µg/mL). Li et al. (2016) isolaram a fucoxantina da alga *U. pinnatifida* e testaram a atividade antioxidante do composto. Comparando com o controlo positivo (EDTA), a atividade quelante da alga foi mais fraca. Os resultados demonstraram uma atividade quelante máxima para a

fucoxantina de 54% a 40 μM . Os valores de EC_{50} foram de 7,03 e 0,45 μM , para a fucoxantina e o EDTA, respetivamente.

Embora o peróxido de hidrogénio não seja um radical livre, mas uma molécula quimicamente estável, é uma molécula chave dentro do sistema redox porque pode facilmente gerar radicais hidroxilo prejudiciais (Sies et al., 2017). Desta forma, a capacidade dos extratos de alga *U. pinnatifida* de eliminar o H_2O_2 foi avaliada. Neste ensaio, os valores de IC_{50} foram menores no EXT 4 (extrato etanólico) ($\text{IC}_{50} = 4,82 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$), demonstrando assim uma melhor atividade antioxidante. Já os extratos com água destilada demonstraram uma menor atividade antioxidante com valores de IC_{50} superiores. Assim, comparando com os valores do IC_{50} com os da literatura, o EXT 4 tem uma capacidade antioxidante alta (Kuethe & Efferth, 2010; Omisore et al., 2005). Os estudos relativos a alguns ensaios antioxidantes são escassos ou inexistentes para os extratos de *U. pinnatifida*, no entanto vão surgindo mais estudos com compostos isolados da alga. Por exemplo, Silva et al. (2022) compararam a atividade antioxidante de fucoïdano de diferentes algas (*Undaria pinnatifida*, *Macrocystis pyrifera* e *Fucus vesiculosus*). Os resultados sugerem que os fucoïdanos têm uma baixa capacidade de doar eletrões, e uma baixa capacidade de quelar metais. A melhor atividade foi obtida com o ensaio do radical hidroxilo. No caso do ensaio com peróxido de hidrogénio, aproximadamente 40-50% do composto foi sequestrado pelos três fucoïdanos.

O ensaio do ABTS baseia-se na capacidade de os antioxidantes presentes no extrato de algas sequestrarem o radical ABTS^+ , em comparação com a capacidade sequestrante do controlo positivo ácido ascórbico. Neste ensaio, há uma reação entre o ABTS e o persulfato de potássio (agente doador de hidrogénio), formando um cromóforo ABTS azul-esverdeado (Re et al., 1999). Neste ensaio, os valores de IC_{50} não foram determinados em nenhum dos extratos, nas concentrações analisadas. Mais uma vez, os ensaios antioxidantes em extratos brutos da alga *U. pinnatifida* são escassos, mas vão surgindo estudos em compostos isolados. Por exemplo, Rafiquzzaman et al. (2013) estudaram a composição química e a atividade antioxidante de uma glicoproteína purificada de *U. pinnatifida* Harvey (UPGP). A glicoproteína demonstrou uma atividade antioxidante dependente da concentração detetada por diferentes ensaios antes e após a digestão in vitro. Os valores de IC_{50} da UPGP não digerida foram $0,25 \pm 0,03$, $0,08 \pm 0,005$, $0,69 \pm 0,12$, e $0,25 \pm 0,08 \text{ mg/mL}$ para o DPPH, ABTS, FRAP, e NO, respetivamente. Num outro estudo, Kim et al. (2015) estudaram a atividade antioxidante de *U. pinnatifida* fermentada com micélio de *Cordyceps militaris* e compararam com micélios não fermentados de *U. pinnatifida* e *C.*

militaris. A atividade antioxidante dos extratos, no ensaio do ABTS, foi comparada com o controle positivo, trolox. O valor obtido para o extrato fermentado de *U. pinnatifida* ($0,396 \pm 0,002$ mM Trolox eq./mg extrato) foi similar ao obtido para os extratos de *U. pinnatifida* ($0,413 \pm 0,006$ mM Trolox eq./mg extrato) e maior que os extratos de *C. militaris*.

A atividade protetora dos extratos de algas em células HepG₂ foi avaliada contra o stress oxidativo induzido por *t*-BOOH. As células HepG₂ são células de hepatoma humano muito utilizadas em estudos de metabolismo de fármacos e de hepatotoxicidade. As células HepG₂ são células com altas taxas de proliferação e uma morfologia semelhante à epitelial, que desempenham muitas funções hepáticas diferenciadas (Donato et al., 2015).

O composto *t*-BOOH pode ser metabolizado pelo citocromo P450 ou íões livres de ferro, levando à formação de radicais livres que iniciam a peroxidação lipídica, afetando a integridade celular e formando ligações covalentes com as moléculas celulares, resultando na morte celular (Lin et al., 2000). A capacidade de um fármaco/extrato hepatoprotetor para reduzir os efeitos prejudiciais ou para preservar os mecanismos fisiológicos hepáticos normais que foram perturbados por um agente hepatotóxico é o princípio do seu efeito protetor (Valentão et al., 2004).

Neste trabalho utilizou-se a curcumina como controle positivo dos ensaios de pré-incubação. A curcumina, um composto ativo da curcuma, exibe potencial terapêutico para o tratamento da diabetes, doenças cardiovasculares e vários tipos de cancro. Este composto é um forte agente antioxidante e anti-inflamatório, possuindo assim propriedades hepatoprotetoras. Além disso, os seus efeitos hepatoprotetores têm sido estudados em vários protocolos de hepatotoxicidade, nomeadamente com agentes indutores de hepatotoxicidade como o acetaminofeno, álcool, tetracloreto de carbono e metais pesados (Khan et al., 2019).

A citotoxicidade do extrato etanólico da alga *U. pinnatifida* foi testada em células HepG₂, às 24 e 48H. Às 24h, os valores de viabilidade celular foram superiores a 50% entre 1-500 µg/mL. O IC₅₀ obtido foi de $516,4 \pm 57,2$ µg/mL. De igual forma, às 48H os valores de viabilidade celular foram superiores a 50% entre 1-500 µg/mL. Neste caso o valor de IC₅₀ foi de $525,9 \pm 71,1$ µg/mL. Num estudo com *U. pinnatifida* e HepG₂ também se observou que os extratos não foram citotóxicos, com valores de IC₅₀ obtidos de 2,0 mg/mL e 0,9 mg/mL para o extrato preparado com água fervente e para o extrato tratado com enzimas digestivas, respetivamente (Okonogi et al., 2007). Pelo contrário, têm surgido na literatura estudos que avaliam a toxicidade de compostos isolados da alga *U. pinnatifida*, como o fucoídano, em células HepG₂. No seu estudo,

Roshan et al. (2014) observaram que após um tratamento com 6 mg/mL de fucoïdano por 24H, o número de HepG₂ reduziu em comparação com o controlo. Tendo em conta os valores encontrados, o intervalo de concentrações testadas para os ensaios de hepatoproteção foi de 1-500 µg/mL.

Neste trabalho, o dano oxidativo nas células HepG₂ foi infligido pela presença do tóxico *t*-BOOH, um composto muito utilizado para induzir stress oxidativo em sistemas *in vitro* e *in vivo*, e para se estudar os efeitos protetores de potenciais agentes antioxidantes (Alía et al., 2005, Mersch-Sundermann et al., 2004). Os resultados demonstraram que a pré-incubação do extrato etanólico da alga wakame com o tóxico nas células HepG₂, resultou em alguma proteção do extrato, sendo esta proteção menos visível com concentrações mais altas da alga. Desta forma, é possível que o extrato etanólico, para além de uma proteção direta, visível através dos resultados *in vitro* dos ensaios antioxidantes (ex: DPPH), possam proteger as células HepG₂ indiretamente, modulando a atividade de enzimas de reparação ou de destoxificação, assim como de enzimas envolvidas na ativação de xenobióticos. A proteção contra a toxicidade do *t*-BOOH neste regime de pré-incubação pode indicar uma regulação negativa de proteínas envolvidas na ativação deste tóxico ou na indução de defesas antioxidantes endógenas (Ferguson et al., 2004; Ross & Kasum, 2002).

5. Conclusão

As algas marinhas têm sido bastante utilizadas, ao longo dos últimos anos, na área da alimentação e medicina, uma vez que possuem compostos bioativos que apresentam atividade biológicas diversas, como a anti-inflamatória, antivírica, anticancerígena, anti-trombótica e anticoagulante, assim como face à sua ação no excesso de peso, hipertensão e dislipidemia. Assim, o objetivo deste estudo consistiu em avaliar a atividade antioxidante, *in vitro*, de extratos de *U. pinnatifida* recorrendo a diferentes técnicas extrativas e solventes. Além disso, avaliou-se também a atividade protetora dos extratos, em células HepG₂, contra o stress oxidativo induzido por *t*-BOOH.

Com base nos resultados obtidos, é possível constatar que, no geral, o extrato 4 (etanólico) apresentou os melhores resultados, quer a nível do ensaio do DPPH e do peróxido de hidrogénio, quer a nível do teor de compostos fenólicos e flavonoides. Desta forma, os resultados obtidos na atividade antioxidante poderão estar relacionados com o teor de compostos fenólicos presentes no extrato. Em termos da atividade hepatoprotetora, o extrato etanólico foi o utilizado para avaliar a proteção em células HepG₂, contra a toxicidade induzida por *t*-BOOH. Este extrato foi o selecionado devido aos resultados mais promissores nos ensaios antioxidantes. O trabalho demonstrou o potencial protetor nas células estudadas do extrato etanólico, em particular das concentrações mais baixas, que pode estar associado com os efeitos antioxidantes pela inibição de radicais livres, e pela indução de defesas intracelulares antioxidantes.

Perspetivas Futuras:

No futuro poderá ser interessante incluir métodos extrativos avançados (e não os tradicionais) como a extração por fluído supercrítico, extração por líquido pressurizado e extração assistida por enzimas. Estes métodos extrativos avançados poderão facilitar a extração de outros compostos com forte atividade antioxidante presentes nas algas, como por exemplo, os florotaninos. Os florotaninos são compostos mais árduos de extrair pelos métodos comuns, uma vez que aparecem na parede das algas e formam complexos.

Tendo em conta que muitos estudos começam a ser feitos com compostos isolados da alga *U. pinnatifida* poderá ser igualmente interessante realizar os mesmos ensaios, mas com compostos isolados, como por exemplo a fucoxantina ou o fucoidano.

Também relativamente à alga em estudo poderá utilizar-se no futuro a alga decorrente de diferentes fases de extração, de modo a identificar e comparar as atividades e o rendimento,

assim como a variação da composição química. Poderá ser igualmente interessante a utilização de extratos aquosos, mas sem as mucilagens, utilizando um processo de precipitação com etanol. Esta precipitação resultará num aumento do teor total de compostos fenólicos, segundo alguns autores.

Por fim, face aos resultados obtidos na atividade hepatoprotetora, no regime de pré-incubação, poderá ser interessante a determinação de outros parâmetros como os níveis de glutathione na forma reduzida e a expressão de enzimas citoprotetoras (ex.: enzima heme oxidase 1 (HO-1), a subunidade catalítica da glutamato-cisteína ligase (GCLC), a subunidade modificadora da glutamato-cisteína (GCLM) e quinona oxidoreductase 1 (NQO1)).

Limitações:

Como limitações para este estudo, destaca-se a escassez de estudos, em particular sobre o extrato bruto da alga wakame, de forma a poder comparar-se com os resultados obtidos. E mesmo quando falamos em compostos isolados, continuam a ser escassos os estudos presentes na literatura.

Referências Bibliográficas

- Alía, M., Ramos, S., Mateos, R., Bravo, L., Goya, L. (2005). Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 19, 119–128. doi: 10.1002/jbt.20061.
- Alves, R.C.; Costa, A.S.G.; Jerez, M.; Casal, S.; Sineiro, J.; Núñez, M.J.; Oliveira, B. Antiradical Activity, Phenolics Profile, and Hydroxymethylfurfural in Espresso Coffee: Influence of Technological Factors. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 12221–12229, doi:10.1021/jf1031229.
- Aminina, N.M.; Karaulova, E.P.; Vishnevskaya, T.I.; Yakush, E.V.; Kim, Y.-K.; Nam, K.-H.; Son, K.-T. Characteristics of polyphenolic content in brown algae of the Pacific Coast of Russia. *Molecules* 2020, 25, 3909.
- Baron A. D. (1998). Postprandial hyperglycaemia and alpha-glucosidase inhibitors. *Diabetes research and clinical practice*, 40 Suppl, S51–S55. [https://doi.org/10.1016/s0168-8227\(98\)00043-6](https://doi.org/10.1016/s0168-8227(98)00043-6)
- Benzie IF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239:70–76. doi: 10.1006/abio.1996.0292.
- Berdahl, D.R. & Nahas, R.I. & Barren, J.P.. (2010). Synthetic and natural antioxidant additives in food stabilization: current applications and future research. 10.1533/9780857090447.2.272.
- Billakanti, J.M.; Catchpole, O.J.; Fenton, T.A.; Mitchell, K.A.; Mackenzie, A.D. Enzyme-assisted extraction of fucoxanthin and lipids containing polyunsaturated fatty acids from *Undaria pinnatifida* using dimethyl ether and ethanol. *Process Biochem.* 2013, 48, 1999–2008.
- Biosci, I. J., Phull, A., Ali, A., Ahmed, M., Zia, M., Haq, I., & Kim, S. J. (2017). In vitro antileishmanial, antibacterial, antifungal and anticancer activity of fucoïdan from *Undaria pinnatifida*. *International Journal of Biosciences (IJB)*, 11(4), 219–227. <https://doi.org/10.12692/ijb/11.4.219-227>
- Boo, H. J., Hyun, J. H., Kim, S. C., Kang, J. I., Kim, M. K., Kim, S. Y., Cho, H., Yoo, E. S., & Kang, H. K. (2011). Fucoïdan from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in A549 human lung carcinoma cells. *Phytotherapy research: PTR*, 25(7), 1082–1086. <https://doi.org/10.1002/ptr.3489>
- Burney, M., Mathew, L., Gaikwad, A., Nugent, E. K., Gonzalez, A. O., & Smith, J. A. (2018). Evaluation Fucoïdan Extracts From *Undaria pinnatifida* and *Fucus vesiculosus* in Combination With

- Anticancer Drugs in Human Cancer Orthotopic Mouse Models. Integrative cancer therapies, 17(3), 755–761. <https://doi.org/10.1177/1534735417740631>
- Cai, H., & Harrison, D. G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circulation research*, 87(10), 840–844. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.10.840>
- Carté B.K. Biomedical potential of marine natural products. *BioScience*. 1996;46:271–286. doi: 10.2307/1312834.
- Cassani, L.; Lourenço-Lopes, C.; Barral-Martinez, M.; Chamorro, F.; Garcia-Perez, P.; Simalgandara, J.; Prieto, M.A. Thermochemical Characterization of Eight Seaweed Species and Evaluation of Their Potential Use as an Alternative for Biofuel Production and Source of Bioactive Compounds. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23, 2355. <https://doi.org/10.3390/ijms23042355>
- Cheong, S. H., Yang, H. W., Ko, E. Y., Ahn, G., Lee, W., Kim, D., Jeon, Y. J., & Kim, K. N. (2016). Anti-inflammatory effects of trans-1,3-diphenyl-2,3-epoxypropane-1-one in zebrafish embryos in vivo model. *Fish & shellfish immunology*, 50, 16–20. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.01.018>
- Chung, T. W., Choi, H. J., Lee, J. Y., Jeong, H. S., Kim, C. H., Joo, M., ... Ha, K. T. (2013). Marine algal fucoxanthin inhibits the metastatic potential of cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(4), 580–585. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.09.019>
- Deyab, M.A.; Abou-Dobara, M.I. Antibacterial activity of some marine algal extracts against most nosocomial bacterial infections. *Egypt. J. Exp. Biol. Bot.* 2013, 9, 281–286.
- Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). Culture and Functional Characterization of Human Hepatoma HepG2 Cells. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 1250, 77–93. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5
- Eberhardt, M. V.; Lee, C. Y.; Liu, R. H. Antioxidant activity of fresh apples. *Nature* 2000, 405, 903–904.
- Faggio, Caterina & Pagano, Maria & Morabito, Marina & Armeli Minicante, Simona & Arfuso, Francesca & Genovese, Giusi. (2014). In vitro assessment of the effect of *Undaria pinnatifida* extracts on erythrocytes membrane integrity and blood coagulation parameters of *Equus caballus*. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2. 10.12980/JCLM.2.2014JCLM-2014-0045.
- Faggio, C., Morabito, M., Minicante, S. A., Piano, G. L., Pagano, M., & Genovese, G. (2015). Potential

- Use of Polysaccharides from the Brown Alga *Undaria pinnatifida* as Anticoagulants. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 58(5), 798–804. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201500400>
- Fahn, S., & Cohen, G. (1992). The oxidant stress hypothesis in Parkinson's disease: evidence supporting it. *Annals of neurology*, 32(6), 804–812. <https://doi.org/10.1002/ana.410320616>
- Ferguson, L.R., Philpott, M., Karunasinghe, N., 2004. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology* 198(1-3), 147-159.
- Ferreira, I. (2007). *Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos*. 32–39.
- Ferreira, R. M., Ramalho Ribeiro, A., Patinha, C., Silva, A. M. S., Cardoso, S. M., & Costa, R. (2019). Water Extraction Kinetics of Bioactive Compounds of *Fucus vesiculosus*. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(18), 3408. <https://doi.org/10.3390/molecules24183408>
- Fujiki, K., H. Matsuyama & T. Yano. 1992. Effect of hot-water extracts from marine algae on resistance of carp and yellowtail against bacterial infections. *Sci. Bull. Fac. Agric., Kyushu Univ.*, 47(20): 137-141.
- Fung, A., Hamid, N., & Lu, J. (2013). 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., ... 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>
- H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones Oxidative stress Vitiligo (2017), pp. 231-237, [10.1007/978-3-540-69361-1_27](https://doi.org/10.1007/978-3-540-69361-1_27)
- He, S.; Zhang, Y.; Yuan, Y.; Farooq, M.A.; Fayyaz, M.S.; Su, D.X.; Zeng, Q.Z.; Rahaman, A. Process optimization and antioxidative activity of polyphenols derived from different seaweed species *Sargassum miyabei*, *Undaria pinnatifida* Suringar, and *Sargassum thunbergii*. *Food Sci. Nutr.* 2022, 10, 2021–2028.
- Heo SJ, Park EJ, Lee KW, Jeon YJ. Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol.* 2005;96:1613–1623.
- Hong, S.W.; Lee, H.S.; Jung, K.H.; Lee, H.; Hong, S.S. Protective effect of fucoidan against acetaminophen-induced liver injury. *Arch. Pharm. Res.* 2012, 35, 1099–1105

- Hosokawa, M., Wanezaki, S., Miyauchi, K., Kurihara, H., Kohno, H., Kawabata, J., Odashima, S., Takahashi, K., 1999. Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell line HL-60. *Food Science and Technology Research*, 5(3), 243–246. <https://doi.org/10.3136/fstr.5.243>
- Hossen, M. J., Cho, J. Y., & Kim, D. (2016). PDK1 in NF- κ B signaling is a target of *Xanthium strumarium* methanolic extract-mediated anti-inflammatory activities. *Journal of ethnopharmacology*, 190, 251–260. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.06.019>
- Hu T, Liu D, Chen Y, Wu J, Wang S. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* in vitro. *Int J Biol Macromol*. 2010;46:193–198.
- Hwang, E. S., & Thi, N. D. (2014). Effects of Extraction and Processing Methods on Antioxidant Compound Contents and Radical Scavenging Activities of Laver (*Porphyra tenera*). *Preventive nutrition and food science*, 19(1), 40–48. <https://doi.org/10.3746/pnf.2014.19.1.040>
- Hwang, J. A., Islam, M. M., Ahmed, S. T., Mun, H. S., Kim, G. M., Kim, Y. J., & Yang, C. J. (2014). Seamustard (*undaria pinnatifida*) improves growth, immunity, fatty acid profile and reduces cholesterol in hanwoo steers. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 27(8), 1114–1123. <https://doi.org/10.5713/ajas.2014.14072>
- Jaeschke, H., Gores, G.J., Cederbaum, A.I., Hinson, J.A., Pessayre, D., Lemasters, J.J. (2002). Forum-mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicological Sciences*, 65, 166–176. doi: 10.1093/toxsci/65.2.166.
- Jia, Z.; Tang, M.; Wu, J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem*. 1999, 64, 555–559.
- Jung, Hyun & Islam, Nurul & Lee, Chan & Jeong, Hyong & Chung, Hae-Young & Woo, Hee Chul & Choi, Jae. (2012). Promising antidiabetic potential of fucoxanthin isolated from the edible brown algae *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*. *Fisheries Science*. 78. 10.1007/s12562-012-0552-y.
- Kadam, S.U.; Álvarez, C.; Tiwari, B.K.; O'Donnell, C.P. Processing of seaweeds. In *Seaweed Sustainability: Food and Non-Food Applications*; Elsevier Inc.: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 61–78. ISBN 9780124199583.
- Kadokaru, Takashi & Toyama, Hiroshi & Yasumoto, Takeshi. (2008). Safety Evaluation of Fucoxanthin purified from *Undaria pinnatifida*. *Journal of The Japanese Society for Food Science and Technology-nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi - J JPN SOC FOOD SCI*

TECHNOL. 55. 304–308. 10.3136/nskkk.55.304.

- Kang, K.S., Kim, I.D., Kwon, R.H. *et al.* *Undaria pinnatifida* fucoïdan extract protects against CCl₄-induced oxidative stress. *Biotechnol Bioproc E13*, 168–173 (2008). <https://doi.org/10.1007/s12257-007-0101-1>
- Kang, M. C., Wijesinghe, W. A., Lee, S. H., Kang, S. M., Ko, S. C., Yang, X., Kang, N., Jeon, B. T., Kim, J., Lee, D. H., & Jeon, Y. J. (2013). Dieckol isolated from brown seaweed *Ecklonia cava* attenuates type II diabetes in db/db mouse model. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 53, 294–298. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.12.012>
- Kang, N., Lee, J. H., Lee, W., Ko, J. Y., Kim, E. A., Kim, J. S., Heu, M. S., Kim, G. H., & Jeon, Y. J. (2015). Gallic acid isolated from *Spirogyra* sp. improves cardiovascular disease through a vasorelaxant and antihypertensive effect. *Environmental toxicology and pharmacology*, 39(2), 764–772. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2015.02.006>
- Karpiński, T. M., & Adamczak, A. (2019). Fucoxanthin–An Antibacterial Carotenoid. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8(8), 239. <https://doi.org/10.3390/antiox8080239>
- Khan, M. N., Cho, J. Y., Lee, M. C., Kang, J. Y., Park, N. G., Fujii, H., & Hong, Y. K. (2007). Isolation of two anti-inflammatory and one pro-inflammatory polyunsaturated fatty acids from the brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 55(17), 6984–6988. <https://doi.org/10.1021/jf071791s>
- Kim, K. J., & Lee, B. Y. (2012). Fucoïdan from the sporophyll of *Undaria pinnatifida* suppresses adipocyte differentiation by inhibition of inflammation-related cytokines in 3T3-L1 cells. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, 32(6), 439–447. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.04.003>
- Kim, W.J. & Kim, Sung-Min & Kim, Hwijun & Oh, Hye-Rim & Lee, Kyung-Bok & Lee, Yoo-Kyung & Park, Yong-Il. (2007). Purification and Anticoagulant Activity of a Fucoïdan from Korean *Undaria pinnatifida* Sporophyll. *Algae*. 22. 247–252. 10.4490/ALGAE.2007.22.3.247.
- Kim, Y. S., Kim, E. K., Hwang, J. W., Han, Y. K., Kim, S. E., Jeong, J. H., Moon, S. H., Jeon, B. T., & Park, P. J. (2015). Radical Scavenging Activities of *Undaria pinnatifida* Extracts Fermented with *Cordyceps militaris* Mycelia. *Journal of microbiology and biotechnology*, 25(6), 820–827. <https://doi.org/10.4014/jmb.1411.11030>
- Knasmüller, S., Parzefall, W., Sanyal, R., Ecker, S., Schwab, C., Uhl, M., Mersch-Sundermann, V., Williamson, G., Hietsch, G., Langer, T., Darroudi, F., Natarajan, A.T. (1998). Use of

- metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutation Research*, 402, 185–202. doi:10.1016/S0027-5107(97)00297-2.
- Knasmüller, S., Mersch-Sundermann, V., Kevekordes, S., Darroudi, F., Huber, W.W., Hoelzl, C., Bichler, J., Majer, B.J. (2004). Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge. *Toxicology*, 198, 315–328. doi:10.1016/j.tox.2004.02.008.
- Kuda T, Tsunekawa M, Goto H, Araki Y. Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsular, Japan. *Japan J Food Comp Anal*. 2005;18:625–633.
- Kuete, V., & Efferth, T. (2010). Cameroonian medicinal plants: pharmacology and derived natural products. *Frontiers in pharmacology*, 1, 123. <https://doi.org/10.3389/fphar.2010.00123>
- Kumar, S. R., Hosokawa, M., & Miyashita, K. (2013). Fucoxanthin: A marine carotenoid exerting anti-cancer effects by affecting multiple mechanisms. *Marine Drugs*, 11(12), 5130–5147. <https://doi.org/10.3390/md11125130>
- Lee, J. H., Ko, J. Y., Samarakoon, K., Oh, J. Y., Heo, S. J., Kim, C. Y., Nah, J. W., Jang, M. K., Lee, J. S., & Jeon, Y. J. (2013). Preparative isolation of sargachromanol E from *Sargassum siliquastrum* by centrifugal partition chromatography and its anti-inflammatory activity. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, 62, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.08.010>
- Lee, J., Lee, S., Synytsya, A., Capek, P., Lee, C. W., Choi, J. W., Cho, S., Kim, W. J., & Park, Y. I. (2018). Low Molecular Weight Mannogalactofucans Derived from *Undaria pinnatifida* Induce Apoptotic Death of Human Prostate Cancer Cells In Vitro and In Vivo. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 20(6), 813–828. <https://doi.org/10.1007/s10126-018-9851-3>
- Lee, H. H., Kim, J. S., Jeong, J. H., Park, S. M., Sathasivam, R., Lee, S. Y., & Kim, C. S. (2022). Effect of Different Solvents on the Extraction of Compounds from Different Parts of *Undaria pinnatifida* (Harvey) Suringar. *Journal of Marine Science and Engineering*, 10(9). <https://doi.org/10.3390/jmse10091193>
- Lee, S. H., Ko, C. I., Ahn, G., You, S., Kim, J. S., Heu, M. S., Kim, J., Jee, Y., & Jeon, Y. J. (2012a). Molecular characteristics and anti-inflammatory activity of the fucoidan extracted from *Ecklonia cava*. *Carbohydrate polymers*, 89(2), 599–606. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.056>
- Lee, S. H., Min, K. H., Han, J. S., Lee, D. H., Park, D. B., Jung, W. K., Park, P. J., Jeon, B. T., Kim, S. K., & Jeon, Y. J. (2012b). Effects of brown alga, *Ecklonia cava* on glucose and lipid metabolism in C57BL/KsJ-db/db mice, a model of type 2 diabetes mellitus. *Food and chemical toxicology*

- : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 50(3-4), 575-582. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2011.12.032>
- Lei Wang, Young-Jin Park, You-Jin Jeon, BoMi Ryu, Bioactivities of the edible brown seaweed, *Undaria pinnatifida*: A review, *Aquaculture*, Volume 495, 2018, Pages 873-880, ISSN 0044-8486, <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.06.079>.
- Li, Y., Li, X., Liu, G., Sun, R., Wang, L., Wang, J., & Wang, H. (2015). Fucosterol attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *The Journal of surgical research*, 195(2), 515-521. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2014.12.054>
- Li, J.; Chen, K.; Li, S.; Feng, J.; Liu, T.; Wang, F.; Zhang, R.; Xu, S.; Zhou, Y.; Zhou, S.; et al. Protective effect of fucoidan from *Fucus vesiculosus* on liver fibrosis via the TGF-beta1/Smad pathway-mediated inhibition of extracellular matrix and autophagy. *Drug Des. Devel.* 2016, 10, 619-630.
- Li, Y., Liu, Y., Wang, Y., Yu, Y., Zeng, Y., Li, L. & Wang, L. (2016). The Bioactivity of Fucoxanthin from *Undaria pinnatifida* in Vitro. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 12(2), 139-148. <https://doi.org/10.3844/ajbbbsp.2016.139.148>
- Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M., Pereira-Wilson, C. (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: relevance of glutathione levels. *Life Sciences*, 79, 2056-2068. doi: 10.1016/j.lfs.2006.06.042.
- Lima, C. F., Valentao, P. C. R., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M., & Pereira-Wilson, C. (2007). Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, 167(2), 107-115. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.01.020>
- Liu, Z., Sun, X., Sun, X. *et al.* Fucoxanthin Isolated from *Undaria pinnatifida* Can Interact with *Escherichia coli* and *Lactobacilli* in the Intestine and Inhibit the Growth of Pathogenic Bacteria. *J. Ocean Univ. China* 18, 926-932 (2019). <https://doi.org/10.1007/s11802-019-4019-y>
- 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. (2022). Fucoxanthin's Optimization from *Undaria pinnatifida* Using Conventional Heat Extraction, Bioactivity Assays and In Silico Studies. *Antioxidants* (Basel, Switzerland), 11(7), 1296. <https://doi.org/10.3390/antiox11071296>
- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Murakami-Funayama, K., & Miyashita, K. (2009). Anti-

- obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Molecular medicine reports*, 2(6), 897–902. https://doi.org/10.3892/mmr_00000189
- Mak, W., Hamid, N., Liu, T., Lu, J., & White, W. L. (2013). Fucoidan from New Zealand *Undaria pinnatifida*: monthly variations and determination of antioxidant activities. *Carbohydrate polymers*, 95(1), 606–614. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.02.047>
- Mak, W., S. K. Wang, T. Liu, N. Hamid, Y. Li, J. Lu, and W. L. White. 2014. Anti-proliferation potential and content of fucoidan extracted from sporophyll of New Zealand *Undaria pinnatifida*. *Frontiers in Nutrition* 1:9–13. doi: 10.3389/fnut.2014.00009.
- Maruyama, H., Tamauchi, H., Kawakami, F., Yoshinaga, K., & Nakano, T. (2015). Suppressive Effect of Dietary Fucoidan on Proinflammatory Immune Response and MMP-1 Expression in UVB-Irradiated Mouse Skin. *Planta medica*, 81(15), 1370–1374. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1557821>
- Mersch-Sundermann, V., Knasmüller, S., Wu, X. J., Darroudi, F., & Kassie, F. (2004). Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, 198(1-3), 329–340. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2004.02.009>
- Min, S. K., Kwon, O. C., Lee, S., Park, K. H., & Kim, J. K. (2012). An antithrombotic fucoidan, unlike heparin, does not prolong bleeding time in a murine arterial thrombosis model: a comparative study of *Undaria pinnatifida* sporophylls and *Fucus vesiculosus*. *Phytotherapy research: PTR*, 26(5), 752–757. <https://doi.org/10.1002/ptr.3628>
- Morisco, F., Vitaglione, P., Amoruso, D., Russo, B., Fogliano, V., Caporaso, N. (2008). Foods and liver health. *Molecular Aspects of Medicine*, 29, 144–150. doi: 10.1016/j.mam.2007.09.003.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65, 55–63. doi: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- Nagata, K., Suzuki, H., Sakaguchi, S. (2007). Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *The Journal of Toxicological Sciences*, 32, 453–468.
- Neri, T. A. N., Rohmah, Z., Ticar, B. F., Pamos, G. N., & Choi, B. D. (2019). Evaluation of sea mustard (*Undaria pinnatifida*) sporophylls from South Korea as fucoidan source and its corresponding antioxidant activities. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 22(1), 1–7.

<https://doi.org/10.1186/s41240-019-0141-4>

- Nishibori, N., Sagara, T., Hiroi, T., Sawaguchi, M., Itoh, M., Her, S., & Morita, K. (2012). Protective effect of *Undaria pinnatifida* sporophyll extract on iron induced cytotoxicity and oxidative stress in PC12 neuronal cells. *Phytopharmacology*. 2012;2(2): 271–84 Retrieved from http://inforesights.com/phytopharmacology/files/pp2_v2i13.pdf.
- Nishino T., Nagumo T., Kiyohara H., Yamada H. Structural characterization of a new anticoagulant fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia kurome*. *Carbohydr. Res.* 1991;211:77–90. doi: 10.1016/0008-6215(91)84147-7.
- Oberg, B. P., McMenamin, E., Lucas, F. L., McMonagle, E., Morrow, J., Ikizler, T. A., & Himmelfarb, J. (2004). Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney international*, 65(3), 1009–1016. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1755.2004.00465.x>
- Oh, J. H., Kim, J., & Lee, Y. (2016). Anti-inflammatory and anti-diabetic effects of brown seaweeds in high-fat diet-induced obese mice. *Nutrition research and practice*, 10(1), 42–48. <https://doi.org/10.4162/nrp.2016.10.1.42>
- Okonogi, S., Duangrat, C., Anuchpreeda, S., Tachakittirungrod, S., & Chowwanapoonpohn, S. (2007). Comparison of antioxidant capacities and cytotoxicities of certain fruit peels. *Food Chemistry*, 103(3), 839–846. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.09.034>.
- Omisore, N. O., Adewunmi, C. O., Iwalewa, E. O., Ngadjui, B. T., Adenowo, T. K., Abegaz, B. M., Ojewole, J. A., & Watchueng, J. (2005). Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, 38(7), 1087–1094. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2005000700012>
- Pan, R.L.; Xiang, L.X.; Wang, P.; Liu, X.Y.; Nie, L.; Huang, W.; Shao, J.Z. Low-molecular-weight fibroblast growth factor 2 attenuates hepatic fibrosis by epigenetic downregulation of Delta-like1. *Hepatology* 2015, 61, 1708–1720.
- Patra, Jayanta Kumar & Lee, Se-Weon & Park, Jae & Baek, Kwang-Hyun. (2016). Antioxidant and Antibacterial Properties of Essential Oil Extracted from an Edible Seaweed *Undaria Pinnatifida*: Antioxidant Potential of Essential Oil from *Undaria Pinnatifida*. *Journal of Food Biochemistry*. 41. 10.1111/jfbc.12278.
- Pedro, B., Guedes, L., André, R., Gaspar, H., Vaz, P., Ascensão, L., ... 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*, 104567. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jff.2021.104567>
- Rafiquzzaman, S. M., Kim, E. Y., Lee, J. M., Mohibullah, M., Alam, Ponce, N. M., Pujol, C. A., Damonte, E. B., Flores, M. L., & Stortz, C. A. (2003). Fucoïdians from the brown seaweed *Adenocystis utricularis*: extraction methods, antiviral activity and structural studies. *Carbohydrate research*, *338*(2), 153–165. [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(02\)00403-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(02)00403-2)
- Phull, A. R., & Kim, S. J. (2018). *Undaria pinnatifida* a Rich Marine Reservoir of Nutritional and Pharmacological Potential: Insights into Growth Signaling and Apoptosis Mechanisms in Cancer. *Nutrition and Cancer*, *70*(6), 956–970. <https://doi.org/10.1080/01635581.2018.1490449>
- Quitério, E., Grosso, C., Ferraz, R., Delerue-Matos, C., & Soares, C. (2022). A Critical Comparison of the Advanced Extraction Techniques Applied to Obtain Health-Promoting Compounds from Seaweeds. *Marine Drugs*, *20*(11), 1–40. <https://doi.org/10.3390/md20110677>
- Quitral, V.; Sepúlveda, M.; Gamero-Vega, G.; Jiménez, P. Seaweeds in bakery and farinaceous foods: A mini-review. *Int. J. Gastron. Food Sci.* 2021, *1*, 100403.
- Rafiquzzaman, S. M., Kim, E. Y., Kim, Y. R., Nam, T. J., & Kong, I. S. (2013). Antioxidant activity of glycoprotein purified from *Undaria pinnatifida* measured by an in vitro digestion model. *International journal of biological macromolecules*, *62*, 265–272. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.09.009>
- Rafiquzzaman, S. M., Kim, E. Y., Lee, J. M., Mohibullah, M., Alam, M. B., Soo Moon, I., ... 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/https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.08.021>
- Randall J. Ruch, Shu-jun Cheng, James E. Klaunig, Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea, *Carcinogenesis*, Volume 10, Issue 6, June 1989, Pages 1003–1008, <https://doi.org/10.1093/carcin/10.6.1003>
- Re R., Pellegrini N., Proteggente A., Pannala A., Yang M., Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;26:1231–1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3.
- Rodríguez-Bernaldo de Quirós, A.; Frecha-Ferreiro, S.; Vidal-Pérez, A.; López-Hernández, J.

- Antioxidant compounds in edible brown seaweeds. *Eur. Food Res. Technol.* 2010, 231, 495–498.
- Roth, G. A., Mensah, G. A., Johnson, C. O., Addolorato, G., Ammirati, E., Baddour, L. M., Barengo, N. C., Beaton, A. Z., Benjamin, E. J., Benziger, C. P., Bonny, A., Brauer, M., Brodmann, M., Cahill, T. J., Carapetis, J., Catapano, A. L., Chugh, S. S., Cooper, L. T., Coresh, J., Criqui, M., ... GBD-NHLBI-JACC Global Burden of Cardiovascular Diseases Writing Group (2020). Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019: Update From the GBD 2019 Study. *Journal of the American College of Cardiology*, 76(25), 2982–3021. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
- Roshan, S., Liu, Yy., Banafa, A. et al. Fucoidan induces apoptosis of HepG2 cells by down-regulating p-Stat3. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. [Med. Sci.]* 34, 330–336 (2014). <https://doi.org/10.1007/s11596-014-1278-0>
- Ross, J.A., Kasum, C.M., 2002. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual Review of Nutrition* 22, 19–34.
- Russo, A., Cardile, V., Lombardo, L., Vanella, L., Vanella, A., & Garbarino, J. A. (2005). Antioxidant activity and antiproliferative action of methanolic extract of Geum quellyon Sweet roots in human tumor cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(3), 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.03.032>
- Saiga, A., S. Tanabe and T. Nishimura, 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 51: 3661–3667. DOI: 10.1021/jf021156g
- Sato, M., Oba, T., Yamaguchi, T., Nakano, T., Kahara, T., Funayama, K., Kobayashi, A., & Nakano, T. (2002a). Antihypertensive effects of hydrolysates of wakame (*Undaria pinnatifida*) and their angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity. *Annals of nutrition & metabolism*, 46(6), 259–267. <https://doi.org/10.1159/000066495>
- Sato, M., Hosokawa, T., Yamaguchi, T., Nakano, T., Muramoto, K., Kahara, T., Funayama, K., Kobayashi, A., & Nakano, T. (2002b). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Journal of agricultural and food chemistry*, 50(21), 6245–6252. <https://doi.org/10.1021/jf020482t>
- 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>
- Singh, S.; Verma, D.K.; Thakur, M.; Tripathy, S.; Patel, A.R.; Shah, N.; Utama, G.L.; Srivastav, P.P.; Benavente-Valdés, J.R.; Chávez-González, M.L.; et al. Supercritical fluid extraction (SCFE) as green extraction technology for high-value metabolites of algae, its potential trends in food and human health. *Food Res. Int.* 2021, 150, 110746
- Singleton, V.L.; Rossi, J.A. Colorimetry of total phenolics with P-molybdic tungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic* 1965, 16, 144–158.
- Srivastava, P., Vyas, V. K., Variya, B., Patel, P., Qureshi, G., & Ghate, M. (2016). Synthesis, anti-inflammatory, analgesic, 5-lipoxygenase (5-LOX) inhibition activities, and molecular docking study of 7-substituted coumarin derivatives. *Bioorganic chemistry*, 67, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.06.004>
- Skriptsova A.V., Shevchenko N.M., Zvyagintseva T.N., Imbs T.I. Monthly changes in the content and monosaccharide composition of fucoidan from *Undaria pinnatifida* (Laminariales, Phaeophyta). *J. Appl. Phycol.* 2010;22:79–86. doi: 10.1007/s10811-009-9438-5.
- South, P. M., Floerl, O., Forrest, B. M., & Thomsen, M. S. (2017). A review of three decades of research on the invasive kelp *Undaria pinnatifida* in Australasia: An assessment of its success, impacts and status as one of the world's worst invaders. *Marine Environmental Research*, 131, 243–257. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.09.015>
- Suetsuna, K., & Nakano, T. (2000). Identification of an antihypertensive peptide from peptic digest of wakame (*Undaria pinnatifida*). *The Journal of nutritional biochemistry*, 11(9), 450–454. [https://doi.org/10.1016/s0955-2863\(00\)00110-8](https://doi.org/10.1016/s0955-2863(00)00110-8)
- Suetsuna, K., Maekawa, K., & Chen, J. R. (2004). Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *The Journal of nutritional biochemistry*, 15(5), 267–272. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2003.11.004>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Synytsya, Andriy & Kim, Woo-Jung & Kim, Sung-Min & Pohl, Radek & Synytsya, Alla & Kvasnicka, Frantisek & Čopíková, Jana & Park, Yong. (2010). Structure and antitumour activity of

- fucoïdan isolated from sporophyll of Korean brown seaweed *Undaria pinnatifida*. *Carbohydrate Polymers*. 81. 41–48. [10.1016/j.carbpol.2010.01.052](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.052).
- Taboada, M. C., R. Mill an, and M. I. Miguez. 2013. Nutritional value of the marine algae wakame (*Undaria pinnatifida*) and nori (*Porphyra purpurea*) as food supplements. *Journal of Applied Phycology* 25 (5):1271–6. doi: [10.1007/s10811-012-9951-9](https://doi.org/10.1007/s10811-012-9951-9)
- Tocaciu, S., Oliver, L. J., Lowenthal, R. M., Peterson, G. M., Patel, R., Shastri, M., McGuinness, G., Olesen, I., & Fitton, J. H. (2018). The Effect of *Undaria pinnatifida* Fucoïdan on the Pharmacokinetics of Letrozole and Tamoxifen in Patients With Breast Cancer. *Integrative cancer therapies*, 17(1), 99–105. <https://doi.org/10.1177/1534735416684014>
- Valentão, P., Carvalho, M., Carvalho, F., Fernandes, E., das Neves, R. P., Pereira, M. L., Andrade, P. B., Seabra, R. M., & Bastos, M. L. (2004). Hypericum androsaemum infusion increases tert-butyl hydroperoxide-induced mice hepatotoxicity in vivo. *Journal of ethnopharmacology*, 94(2-3), 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.06.012>
- Vidyashankar, S.K., Mitra, S., Nandakumar, K.S. (2010). Liv.52 protects HepG2 cells from oxidative damage induced by tert-butyl hydroperoxide. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 333, 41–48. doi: [10.1007/s11010-009-0202-6](https://doi.org/10.1007/s11010-009-0202-6).
- Vishchuk O.S., Ermakova S.P., Zvyagintseva T.N. Sulfated polysaccharides from brown seaweeds *Saccharina japonica* and *Undaria pinnatifida*: Isolation, structural characteristics, and antitumor activity. *Carbohydr. Res.* 2011;346:2769–2776. doi: [10.1016/j.carres.2011.09.034](https://doi.org/10.1016/j.carres.2011.09.034).
- Wang, Lei & Ryu, BoMi & Kim, Won-Suk & Kim, Gwang Hoon & Jeon, You-Jin. (2017). Protective effect of gallic acid derivatives from the freshwater green alga *Spirogyra* sp. against ultraviolet B-induced apoptosis through reactive oxygen species clearance in human keratinocytes and zebrafish. *ALGAE*. 32. 379–388. [10.4490/algae.2017.32.11.29](https://doi.org/10.4490/algae.2017.32.11.29).
- Wang L, Lee WW, Yang HW, Ryu BM, Cui YR, Lee SC, Lee TG, Jeon YJ. Protective Effect of Water Extract of Citrus Pomace against AAPH-Induced Oxidative Stress *In Vitro* in Vero Cells and *In Vivo* in Zebrafish. *Prev Nutr Food Sci*. 2018 Dec;23(4):301–308. doi: [10.3746/pnf.2018.23.4.301](https://doi.org/10.3746/pnf.2018.23.4.301). Epub 2018 Dec 31. PMID: 30675459; PMCID: PMC6342543.
- Wang, S. K., Li, Y., White, W. L., & Lu, J. (2014). Extracts from New Zealand *Undaria pinnatifida* Containing Fucoxanthin as Potential Functional Biomaterials against Cancer in Vitro. *Journal of functional biomaterials*, 5(2), 29–42. <https://doi.org/10.3390/jfb5020029>
- Wang, T., Jónsdóttir, R., & Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging

- and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240–248. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.02.041>
- W.-L. Lin, C.-J. Wang, Y.-Y. Tsai, C.-L. Liu, J.-M. Hwang, T.-H. Tseng Inhibitory effect of esculetin on oxidative damage induced by *t*-butyl hydroperoxide in rat liver *Archives of Toxicology*, 74 (2000), pp. 467–472
- Wu, J., Li, H., Wang, X., Zhang, X., Liu, W., Wang, Y., Zhang, Y., Pan, H., Wang, Q., & Han, Y. (2019). Effect of polysaccharide from *Undaria pinnatifida* on proliferation, migration and apoptosis of breast cancer cell MCF7. *International journal of biological macromolecules*, 121, 734–742. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.086>
- Xu, S. Y., Huang, X., & Cheong, K. L. (2017). Recent advances in marine algae polysaccharides: Isolation, structure, and activities. *Marine Drugs*, 15(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/md15120388>
- Yamauchi, R., Tatsumi, Y., Asano, M., Kato, K. and Ueno, Y., 1988. Effect of metal salts and fructose on the autoxidation of methyl linoleate in emulsions. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52, 849 –850
- Yang C., Chung D., Shina I., Lee H., Kim J., Lee Y., You S. Effects of molecular weight and hydrolysis conditions on anticancer activity of fucoidans from sporophyll of *Undaria pinnatifida*. *Int. J. Biol. Macromol.* 2008;43:433–437. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2008.08.006.
- Yang, L., Wang, P., Wang, H., Li, Q., Teng, H., Liu, Z., Yang, W., Hou, L., & Zou, X. (2013). Fucoidan derived from *Undaria pinnatifida* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells via the ROS-mediated mitochondrial pathway. *Marine drugs*, 11(6), 1961–1976. <https://doi.org/10.3390/md11061961>
- Yang, G., Li, Q., Peng, J., Jin, L., Zhu, X., Zheng, D., ... Xie, X. (2021). Fucoxanthin regulates Nrf2 signaling to decrease oxidative stress and improves renal fibrosis depending on Sirt1 in HG-induced GMCs and STZ-induced diabetic rats. *European Journal of Pharmacology*, 913(June), 174629. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174629>
- Yu, R. X., Hu, X. M., Xu, S. Q., Jiang, Z. J., & Yang, W. (2011). Effects of fucoxanthin on proliferation and apoptosis in human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells via JAK/STAT signal pathway. *European journal of pharmacology*, 657(1-3), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.12.006>
- Zhang H, Tang Y, Zhang Y, Zhang S, Qu J, Wang X, et al. Fucoxanthin: a promising medicinal and nutritional ingredient. <http://dx.doi.org/101155/2015/431047>. 2015;2015:2–4.

Zhang, Hui & Zunting, Pang & Han, Chunchao. (2014). *Undaria pinnatifida* (Wakame): A Seaweed with Pharmacological Properties. *Science International*. 2. 32-36. 10.17311/sciintl.2014.32.36.

Zhao, Y., Zheng, Y., Wang, J., Ma, S., Yu, Y., White, W. L., Yang, S., Yang, F., & Lu, J. (2018). Fucoidan Extracted from *Undaria pinnatifida*: Source for Nutraceuticals/Functional Foods. *Marine drugs*, 16(9), 321. <https://doi.org/10.3390/md16090321>