

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Organismos marinhos na Cosmética

Inês Alexandra Barros Silva

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:

Professora Doutora Maria da Graça Costa Miguel

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Organismos marinhos na Cosmética

Inês Alexandra Barros Silva

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professora Doutora Maria da Graça Costa Miguel

Organismos marinhos na Cosmética

Declaração de autoria de trabalho:

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Faro, outubro de 2021

Copyright © 2021 Inês Alexandra Barros Silva

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Agradecimentos

Primeiramente, o meu maior agradecimento à Professora Doutora Maria da Graça Costa Miguel ao ter aceitado orientar-me nesta dissertação. Quero ainda agradecer por toda a ajuda que me disponibilizou prontamente, pelo tempo e apoio prestados.

À Universidade do Algarve e a todos os docentes que a incorporam agradeço a excelente formação que me ofereceram ao longo destes cinco anos bem como todo o crescimento não só profissional, mas também pessoal que me proporcionaram. Às equipas de farmacêuticos do Hospital CUF Descobertas e a toda a equipa da Farmácia da Baixa, agradeço por me terem facultado a oportunidade de estágio e por todo o extenso acompanhamento que me ofereceram durante este período de aprendizagem.

Agradeço a toda a minha família, em especial aos meus pais e irmã por me terem apoiado sempre, acreditado em mim e terem estado do meu lado, sem eles a realização deste curso não seria possível.

Aos meus amigos, um grande obrigada por todos os momentos que passamos juntos dentro e fora da Faculdade, pela vossa ajuda e sobretudo por todo o companheirismo que tiveram para comigo. Ao Afonso, agradecer-te por todo o apoio, força, compreensão e por todas as palavras de incentivo. Sem ti, este curso teria sido muito mais difícil.

A todos aqueles que se cruzaram no meu percurso e que contribuíram para que esta etapa chegasse ao fim, muito obrigada. E por último, mas não menos importante, quero agradecer por todas as memórias e aprendizagens à Feminis Ferventis – Tuna Académica Feminina da Universidade do Algarve. Sem vocês a minha experiência na Universidade não teria sido a mesma.

Resumo

A indústria cosmética é um setor em crescimento, onde a procura por novos compostos ativos para melhorar e criar produtos inovadores é bastante importante. As preferências do consumidor evoluíram e surgiu uma consciência mais ecológica, pelo que, os consumidores exigem mais produtos naturais, com menos implicações ambientais e menos efeitos tóxicos. Nesse contexto, as macroalgas podem representar uma fonte rica em diferentes metabolitos, com fácil acessibilidade para a obtenção dessas moléculas.

A radiação ultravioleta da luz solar é o principal fator ambiental que induz o envelhecimento da pele humana e resulta na acumulação de pigmentos e na formação de rugas. A pele humana é frequentemente afetada pelo stresse oxidativo causado pela exposição contínua à radiação solar ultravioleta.

As macroalgas estão naturalmente expostas ao stress oxidativo, pelo que desenvolvem compostos bioativos com capacidade antioxidante, sendo capazes de metabolizar os radicais livres e conseqüentemente, neutralizar os efeitos nocivos induzidos pelo stresse oxidativo. Desta forma, os compostos bioativos de macroalgas podem integrar formulações cosméticas contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta, apresentando um efeito de anti-envelhecimento.

A presente dissertação foca-se na procura de novos compostos com atividade antioxidante obtidos a partir de organismos marinhos (particularmente macroalgas) com potencial na indústria cosmética, através da análise de estudos realizados *in vitro*.

Concluiu-se que as macroalgas de um determinado filo, nomeadamente Phaeophyceae, apresentam na sua composição química maior quantidade de compostos com atividade antioxidante, possuindo uma elevada atividade antioxidante *in vitro*. Estas macroalgas devem ser consideradas para futuros estudos *in vivo* e em formulações de produtos cosméticos inovadores.

Palavras-chave: antioxidante, compostos bioativos, Phaeophyceae, Chlorophyta, Rodophyta

Abstract

The cosmetic industry is a growing sector, where the search for new active compounds to improve and create innovative products is crucial. Consumer preferences have evolved and a greener awareness has emerged, whereby consumers demand more natural products, with fewer environmental implications and less toxic effects. In this context, macroalgae can represent a rich source of different metabolites with easy accessibility to obtain these molecules.

Ultraviolet radiation from sunlight is the main environmental factor that induces the aging of human skin and results in the accumulation of pigments and the formation of wrinkles. Human skin is often affected by oxidative stress caused by continuous exposure to ultraviolet solar radiation.

Macroalgae are naturally exposed to oxidative stress, so they develop bioactive compounds with antioxidant capacity, being able to metabolize free radicals and, consequently, neutralize the harmful effects induced by oxidative stress. In this way, macroalgal bioactive compounds can integrate cosmetic formulations against the harmful effects of ultraviolet radiation, presenting an anti-aging effect.

This dissertation focuses on the search for new compounds with antioxidant activity obtained from marine organisms (particularly macroalgae) with potential in the cosmetic industry, through the analysis of *in vitro* studies.

It was concluded that the macroalgae of a certain phylum, namely Phaeophyceae, present in their chemical composition a greater amount of compounds with antioxidant activity, having a high antioxidant activity *in vitro*. These macroalgae should be considered for future *in vivo* studies and in innovative cosmetic product formulation

Keywords: antioxidant, bioactive compounds, Phaeophyceae, Chlorophyta, Rodophyta

Índice de matérias

Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Índice de figuras.....	VIII
Abreviaturas.....	X
1. Introdução.....	1
2. Radicais livres.....	2
2.1 Produção de radicais livres no corpo humano.....	2
2.2 Vias para a atividade de produção de radicais livres.....	3
2.3 Reação em cadeia após formação do radical livre.....	5
3. Antioxidantes	6
3.1 Classificação dos antioxidantes	6
3.1.1 Antioxidantes primários e secundários.....	6
3.1.2 Antioxidantes endógenos e exógenos.....	7
3.1.3 Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos.....	7
3.1.3.1 Antioxidantes enzimáticos endógenos.....	7
3.1.3.2 Antioxidantes não enzimáticos endógenos.....	9
3.1.3.2.1 Proteínas de ligação a metais	9
3.1.3.2.2 Coenzima Q ₁₀	10
3.1.3.2.3 Glutathiona.....	11
3.1.3.2.4 Ácido lipoico.....	12
3.1.3.2.5 Ácido úrico.....	12
3.1.3.2.6 Melatonina.....	13
3.1.3.2.7 Bilirrubina.....	13
3.1.3.2.8 Poliaminas.....	14
3.1.3.3 Antioxidantes não enzimáticos exógenos.....	15
3.1.3.3.1 Ácido ascórbico.....	15
3.1.3.3.2 Vitamina E.....	16
3.1.3.3.3 Carotenoides.....	17

3.1.3.3.4 Vitamina A.....	18
3.1.3.3.5 Compostos fenólicos.....	19
3.1.3.3.5.1 Ácido fenólicos.....	20
3.1.3.3.5.1.1 Flavonoides.....	20
3.1.3.3.6 Minerais.....	22
3.1.4 Linhas de defesa.....	22
3.2 Mecanismos para a determinação da atividade antioxidante.....	23
3.2.1 HAT: <i>Hydrogen Atom Transfer</i> (Transferência de Átomo de Hidrogénio).....	23
3.2.2 SET: <i>Single Electron Transfer Mechanism</i> (Mecanismo de Transferência de Eletrão Único).....	24
3.2.3 SET-PT: <i>Single Electron Transfer Accompanied with Proton Transfer</i> (Transferência de eletrão único acompanhada de transferência de próton).....	24
3.2.4 SPLET: <i>Sequential Proton Loss Electron Transfer</i> (Transferência de eletrão e perda sequencial de próton).....	25
3.2.5 TMC: <i>Transition Metals Chelation</i> (Quelação de metais de transição).....	25
3.3 Métodos para a determinação da atividade antioxidante.....	27
4. Radiação Ultravioleta e produção de ERO.....	30
5. Envelhecimento.....	31
6. Cosmética.....	31
6.1 História.....	31
6.2 Definição.....	32
7. Cosmecêuticos.....	33
7.1 Cosmecêuticos Marinhos.....	37
7.1.1 Macroalgas.....	39
7.1.2 Microrganismos marinhos.....	40
7.1.3 Invertebrados marinhos.....	41
7.2 Papel dos antioxidantes nos cosmecêuticos marinhos.....	41
7.2.1 Macroalgas e as formulações cosmecêuticas.....	42

7.2.2 Exemplos de cosmecêuticos comercializados contendo macroalgas com ação antioxidante.....	42
8. Composição química das macroalgas.....	43
8.1 Compostos fenólicos.....	43
8.1.1 Florotaninos.....	44
8.2 Polissacáridos.....	46
8.2.1 Fucoidano e laminarana.....	47
8.2.2 Carregeninas.....	47
8.2.3 Ulvana	47
8.3 Aminoácidos semelhantes a micosporina.....	48
8.4 Carotenoides.....	48
9. Atividade antioxidante de extratos de macroalgas e seus componentes	49
9.1 Macroalgas castanhas – Filo Phaeophyceae	49
9.2 Macroalgas verdes – Filo Chlorophyta.....	64
9.3 Macroalgas vermelhas – Filo Rodophyta	67
10. Conclusão.....	76
11. Bibliografia.....	77

Índice de figuras

Figura 2.1 – Modelo esquemático da geração de ERO na mitocôndria. CAT (catalase); GPx (glutaciona peroxidase); SOD (superóxido dismutase); Q (coenzima Q ou ubiquinona)	4
Figura 2.2 – Representação esquemática da formação de radicais livres e reações de terminação.....	6
Figura 3.1 – Mecanismo seguido por enzimas antioxidantes. GR (glutaciona redutase); GPx (glutaciona peroxidase); SOD (superóxido dismutase); CAT (catalase).....	8
Figura 3.2 – Reação de Fenton.....	9
Figura 3.3 – Formas redox da CoQ10 ubiquinona (forma oxidada), ubiquinol (forma reduzida) e semiquinona (semi-oxidada). O ciclo Q dentro da membrana da matriz permite a transferência de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana ajudando a gerar o gradiente eletroquímico para a produção de ATP.....	11
Figura 3.4 – Exemplos de poliaminas.....	15
Figura 3.5 – Ácido ascórbico e a sua forma oxidada, ácido desidroascórbico	15
Figura 3.6 – Estruturas químicas das oito isoformas de vitamina E.....	16
Figura 3.7 - A interação da peroxidação lipídica com antioxidantes: a rede antioxidante...	17
Figura 3.8 – Estruturas químicas de carotenoides.....	18
Figura 3.9 – Estrutura química de <i>trans</i> -retinol.....	19
Figura 3.10 – a) Estrutura química dos derivados do ácido hidroxibenzoico; b) estrutura química dos derivados do ácido hidroxicinâmicos.....	20
Figura 3.11 – Estrutura nuclear dos flavonoides.....	21
Figura 3.12 – Estrutura química dos flavonoides e respetiva classe.....	21
Figura 7.1 – Exemplos de compostos bioativos isolados de (A) bactérias, (B) macroalgas, (C) microalgas, (E) corais, (F) equinodermos e (G) esponjas, relatados como candidatos adequados para a formulação de cosméticos	39
Figura 8.1 – Exemplo de uma alga castanha (<i>Fucus vesiculosus</i>). (A) Localização dos diferentes compostos antioxidantes: (B) fenólicos e florotaninos, localizados nos fisodos nas células superficiais; (C) laminarana, localizada nos vacúolos da célula das algas marinhas, e fucoidana, embutida na parede celular e nos espaços intercelulares; e (D)	

carotenoides como o pigmento acessório localizado na membrana dos tilacoides também hospedando a clorofila a, que é responsável pela fotossíntese das algas.....	45
Figura 8.2 – estrutura química de floroglucinol.....	45
Figura 8.3 – Tipos primários de florotaninos com base em critérios de acoplamento oxidativo (A): Fucóis; (B): Floretóis; (C):Fucofloretóis.....	46
Figura 8.4 – Estrutura química das carrageninas.....	47
Figura 9.1 – <i>Macrocystis pyrifera</i>	50
Figura 9.2 – <i>Ascophyllum nodosum</i>	52
Figura 9.3 – <i>Fucus vesiculosus</i>	57
Figura 9.4 – (A): <i>Laminaria saccharina</i> ; (B): <i>Laminaria digitata</i> ; (C): <i>Himanthalia elongata</i>	58
Figura 9.5 – <i>Ulva intestinalis</i>	66
Figura 9.6 – <i>Gracilaria bursa-pastoris</i>	69
Figura 9.7 – <i>Palmaria palmata</i>	75

Abreviaturas

AAPH - 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dicloridrato, do inglês: *2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride*

ABAP - 2,2 'azobis (2-amidinopropano) cloridrato, do inglês: *2,2' azobis (2-amidinopropane) chlorhydrate*

ABTS - 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico

AcT – Acetona

AcEt - Acetato de etilo

ADA - Ácido desidroascórbico

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ADHL - Ácido di-hidrolipoico

AFMK - N(1)-acetil-N(2)-formil-5-metoxiquinuramina

AMK - N1-acetil-5-metoxiquinuramina

AP - Afinidade de protão

ASAE - Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

ATP - Trifosfato de adenosina, do inglês: *Adenosine Triphosphate*

AU - Ácido úrico

BHA - Beta-hidroxiácido

BHT - Hidroxitolueno butilado, do inglês: *butylated hydroxytoluene*

CAT - Catalase

CCIT - Conteúdo de clorofila total

CCT - Conteúdo de carotenoides total

CE - Comissão Europeia

CE₅₀ - Concentração eficiente ou índice de oxidação

CI₅₀ - Concentração de inibição de 50%

CFIT - Conteúdo de flavonoides total

CFT - Conteúdo fenólico total

Clf - Clorofórmio

ClO⁻ - Hipoclorito

CoQ10 - Coenzima Q10

c3OHM - Hidroximelatonina cíclica

CTE - Cadeia de transporte de elétrons

Cu²⁺ - Iões cobre livre

CUPRAC - Capacidade antioxidante redutora cúprica, do inglês: *Cupric reducing antioxidant capacity*

CYP450 - Citocromo P450

DCFH2-DA - Diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína, do inglês: *dichloro-dihydro-fluorescein diacetate*

DHA - Ácido docosa-hexaenóico, do inglês: *Docosa-hexaenoic-acid*

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, do inglês: *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*

DTPA – Ácido dietilenotriamina pentacético, do inglês: *diethylenetriamine pentaacetic acid*

EAA - Equivalentes de ácido ascórbico

EAG - Equivalentes de ácido gálico

EC - Equivalentes de catequina

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês: *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EDP - Entalpia de dissociação de prótons

EM - Estados-membros

EMA - Agência Europeia de Medicamentos, do inglês: *European Medicines Agency*

EQ - Equivalentes de quercetina

ERA - Espécies reativas de azoto

ERO - Espécies reativas de oxigénio

Et – Etanol

ET - Equivalente de Trolox

ETE - Entalpia de transferência de eletrões

EUA - Estados Unidos da América

FAD - Dinucleótido de flavina e adenina, do inglês: *flavin adenine dinucleotide*

FC - Folin Ciocalteu

Fe²⁺ - Iões de ferro

Fe(CN)₆³⁻ - Ferricianeto

Fe³⁺ -TPTZ - Complexo de tripiridiltriazina férrico

FDA - *Food and Drug Administration*

FD&C - *Food, Drug and Cosmectic*

FM - Florotaninos ligados à membrana

FMe - Florotanino extraído ligado à membrana

FP&L - *Lei Fair Packagind and Labeling*

FRAP - Poder antioxidante redutor férrico, do inglês: *Ferric reducing antioxidant power*

FS – Florotaninos solúveis

GSH - Glutaciona reduzida

GSSG - Glutaciona oxidada

GST - Glutaciona transferase

GPx - Glutaciona peroxidase

GR - Glutaciona redutase

HaCaT - Células queratinócitos humanos imortalizados

HAT: Transferência de Átomo de Hidrogénio, do inglês: *Hydrogen Atom Transfer*

Hex – Hexano

HOMO - *Highest occupied molecular orbital*

LUMO - *Lowest unoccupied molecular orbital*

NADH - Dinucleótido de nicotinamida adenina reduzida, do inglês: *nicotinamide adenine dinucleotide reduced*

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenine, do inglês: *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

MAPKs - *mitogen activated protein kinases*

MAAs - Aminoácido semelhante a micosporina, do inglês: *mycosporine-like amino acid*

ME - Matriz extracelular

MMPs - Metaloproteinases de matriz, do inglês: *matrix metalloproteinases*

NF- κ B - Fator nuclear kappa B, do inglês: *nuclear factor kappa B*

NO - Monóxido de azoto

ORAC - Capacidade de absorvância do radical oxigênio, do inglês: *oxygen radical absorbance capacity*

PA-1 - Proteína ativadora 1

PAs - Poliaminas

PIA - Potencial de Ionização Adiabática

PLMs - Proteínas de ligação a metais

p.s. - Peso seco

PUFAs - Ácidos gordos poli-insaturados, do inglês: *Polyunsaturated fatty acids*

QH2 – Forma reduzida da coenzima Q

Q - Coenzima Q ou ubiquinona

*Q- - Anião semiquinona intermediário instável

RUV - Radiação ultravioleta

SET - Mecanismo de Transferência de Eletrão Único, do inglês: *Single Electron Transfer Mechanism*

SET-PT - Transferência de eletrão único acompanhada de transferência de próton, do inglês: *Single Electron Transfer Accompanied with Proton Transfer*

SOD - Superóxido dismutase

SPLET - Transferência de eletrão e perda sequencial de próton, do inglês: *Sequential Proton Loss Electron Transfer*

TA - Temperatura ambiente

TEAC - Capacidade antioxidante equivalente de trolox, do inglês: *Trolox equivalent antioxidant capacity*

TRAP - Parâmetro antioxidante de captura total do radical peroxil, do inglês: *total peroxy radical-trapping antioxidant parameter*

Trx – Tioredoxina

TrxR– Tioredoxina redutase

UE- União Europeia

UV - Ultravioleta

1. Introdução

Os cosméticos tornaram-se cada vez mais importantes no quotidiano da população, prova disso é o seu uso regular por um número crescente de pessoas e o facto de grandes quantidades de produtos cosméticos serem consumidos todos os anos.

A utilização de cosméticos na sociedade moderna visa a promoção da higiene pessoal; o aumento da atratividade e autoestima através da utilização de maquilhagem; a proteção da pele e do cabelo da luz ultravioleta prejudicial, poluentes e outros fatores ambientais; prevenção do envelhecimento e, em geral, para ajudar as pessoas a terem uma vida mais satisfatória (1).

Um novo conceito na indústria cosmética são os cosmecêuticos, uma mistura entre “produtos cosméticos” e “produtos farmacêuticos”. Os cosmecêuticos caracterizam-se por fornecerem benefícios terapêuticos já que possuem ingredientes ativos que se destinam a ter um efeito fisiológico resultante de uma ação farmacológica quando comparados com um cosmético inerte. Por esta razão, os cosmecêuticos são muito procurados pelos consumidores e amplamente comercializados, tornando-os um dos segmentos de crescimento mais rápido do mercado de cuidados pessoais (2)(3).

Por sua vez, o facto da população estar cada vez mais consciencializada para o risco do uso de muitos produtos químicos sintéticos em cosméticos, fez com que os compostos obtidos a partir de recursos naturais obtivessem um enorme reconhecimento, pelo que a procura por cosmecêuticos de origem vegetal e de origem marinha tenha aumentado exponencialmente devido às suas propriedades químicas e biológicas únicas (4).

Uma vez que a indústria cosmética é um setor económico em crescimento em todo o mundo, com o mercado cosmético europeu avaliado em 79,8 bilhões em 2019 (5), faz sentido que este setor de base científica, de ritmo acelerado e altamente inovador tente corresponder à procura dos consumidores. Neste sentido, a indústria cosmética através de uma procura contínua por ingredientes inovadores, está a mudar progressivamente para ingredientes bioativos naturais e está a revelar um enorme interesse por organismos marinhos. Estes são uma grande fonte de uma variedade de metabolitos: polissacáridos, glicoproteínas, polifenóis, terpenos, carotenoides, vitaminas, ácidos gordos e, ainda, enzimas que oferecem um amplo espectro de atividades (6).

A presente dissertação tem como objetivo fazer uma revisão bibliográfica relativamente a novos compostos de origem marinha que possam ser aplicados como ingredientes ativos em cosmecêuticos. Para cada composto ou grupos de compostos serão abordadas as atividades antioxidantes em ensaios *in vitro* e/ou *in vivo* e, conseqüentemente, a sua utilidade na indústria

cosmética. Antes de iniciar esta revisão, faz-se no presente trabalho uma breve revisão sobre os conceitos de radicais livres, o que são antioxidantes e alguns testes para a determinação destas atividades.

2. Radicais Livres

Um radical livre pode ser definido como qualquer espécie química que possui um elétron desemparelhado numa orbital atômica capaz de existir independentemente. Muitos radicais são instáveis, altamente reativos e podem doar ou aceitar um elétron de outras moléculas, comportando-se, portanto, como oxidantes ou redutores.

As espécies reativas de oxigênio (ERO), compreendendo radicais livres (ex: anião superóxido $O_2^{\cdot-}$, radical hidroxilo $\cdot OH$) ou não (ex: peróxido de hidrogênio H_2O_2), oxigênio singlete (1O_2). As espécies reativas de azoto (ERA) são o monóxido de azoto ($\cdot NO$), radical peroxinitrilo ($ONOO\cdot$) e dióxido de azoto ($\cdot NO_2$) (7). Estas espécies são altamente reativas, capazes de danificar moléculas biologicamente relevantes no núcleo e nas membranas das células, como ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas, hidratos de carbono e lípidos, levando a danos celulares e rotura homeostática (8)(9).

2.1 Produção de radicais livres no corpo humano

Os radicais livres e ERO são derivados de processos metabólicos essenciais normais no corpo humano ou de fontes externas, como exposição a raios ionizantes, ozono, tabagismo, poluentes do ar e produtos químicos industriais (8).

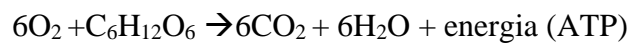
A formação de radicais livres ocorre continuamente nas células como consequência de reações enzimáticas e não enzimáticas. As reações enzimáticas, que servem como fonte de radicais livres, incluem aquelas envolvidas na cadeia respiratória, na fagocitose, na síntese de prostaglandinas e no sistema do citocromo P450 (CYP450) (8).

Algumas fontes geradoras internamente de radicais livres são a mitocôndria e os peroxissomas, ou seja, são gerados em processos aeróbicos, como respiração celular. A inflamação, exposição a infecções microbianas envolvendo ativação de fagócitos e atividade física intensiva são também outros fatores que geram radicais livres. Já as fontes de radicais livres gerados externamente incluem o fumo do cigarro, os poluentes ambientais, as radiações ionizantes e ultravioleta (UV), certos medicamentos e pesticidas, solventes industriais e ozono (7)(8).

2.2 Vias para a atividade de produção de radicais livres

De acordo com a "teoria do radical livre" proposta por Harman, o dano às macromoléculas celulares através da produção de radicais livres em organismos aeróbios é um fator importante de vida (10). Os radicais livres são subprodutos naturais do metabolismo aeróbio das células e podem ser endógenos ou exógenos. A formação de radicais livres endógenos ocorre continuamente nas células como resultado de reações enzimáticas e não enzimáticas. Os radicais livres endógenos são formados no corpo através de quatro processos diferentes (8).

Processo I: Na primeira fase, como parte do metabolismo natural de nutrientes dependentes de oxigénio, as moléculas de energia trifosfato de adenosina (ATP) são libertadas pela mitocôndria, ao consumir oxigénio e produzir água (respiração aeróbica).



Subprodutos \rightarrow H_2O_2 , OH^\cdot , radicais superóxido, etc.

Neste processo, como resultado da redução incompleta da molécula de oxigénio, peróxido de hidrogénio, radicais hidroxilo, superóxido e outros subprodutos indesejáveis são gerados inexoravelmente. Os radicais superóxido são produzidos principalmente em dois locais importantes na cadeia de transporte de eletrões durante o processo metabólico: no complexo I (dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH) desidrogenase) e no complexo III (ubiquinona-citocromo c redutase) (Figura 2.1). A forma reduzida da coenzima Q (QH_2) é formada como resultado da transferência de eletrões do complexo I ou II para a coenzima Q ou ubiquinona (Q). A forma reduzida QH_2 regenera a coenzima Q através de um anião semiquinona intermediário instável ($^{\cdot}\text{Q}^-$) no ciclo Q. O intermediário $^{\cdot}\text{Q}^-$ passa os seus eletrões para o oxigénio molecular e forma o radical superóxido quase imediatamente. Uma vez que o superóxido não é produzido por enzimas, o desencadeamento de ERO aumenta à medida que a taxa de metabolismo aumenta (11).

O anião superóxido é posteriormente convertido em peróxido de hidrogénio pela superóxido dismutase mitocondrial (12).

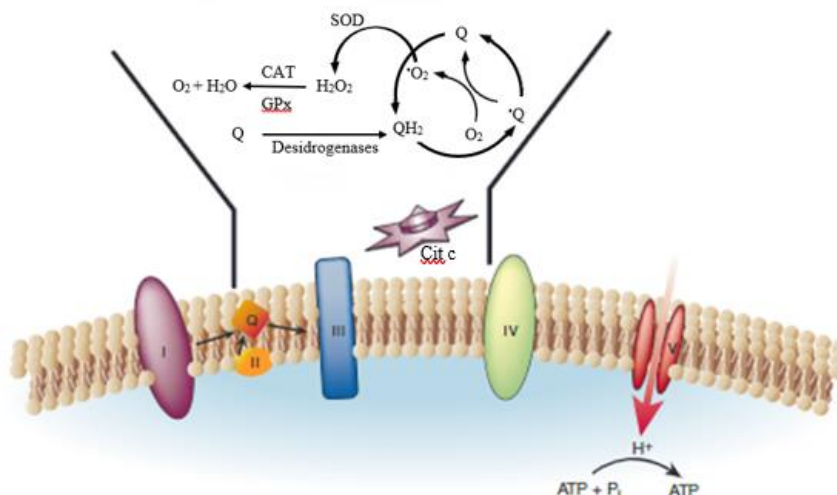


Figura 2.1- Modelo esquemático da geração de ERO na mitocôndria. CAT (catalase); GPx (glutathiona peroxidase); SOD (superóxido dismutase); Q (coenzima Q ou ubiquinona); QH₂ (reduzida da coenzima Q); •Q- (anião semiquinona intermediário instável). (Adaptado de (11)).

Processo II: Oxidantes (radicais livres, ERO) como NO, O₂^{•-}, H₂O₂ e outros são libertados pelo sistema imunológico, os glóbulos brancos, para destruir os microrganismos patogênicos, parasitas, vírus, etc., como componente importante de um mecanismo de defesa. Os radicais livres atacam moléculas próximas para atingirem estabilidade, resultando na geração de um novo radical livre que desencadeia uma reação em cadeia. Quando o processo é iniciado, este faz com que as biomoléculas das células vivas saudáveis sofram modificações, resultando em danos celulares (13).

Processo III: Peroxissomas produzem peróxido de hidrogénio e calor, um subproduto formado devido à quebra de ácidos gordos e da degradação de outras moléculas citosólicas enquanto na mitocôndria os ácidos gordos são oxidados para produzir ATP e água. Normalmente, uma enzima antioxidante, a catalase, degrada esses peróxidos. No entanto, parte do peróxido de hidrogénio é expelido e causa danos noutras partes da célula. Uma vez que as gorduras com poli-insaturação possuem número de múltiplas ligações duplas, assim, ao serem oxidadas, produzem um excesso de radicais livres, os peróxidos lipídicos (14).

Processo IV: Uma das principais defesas do corpo na biotransformação de xenobióticos são as enzimas do CYP450, oxidando-os. Durante este processo de oxidação há também a formação de radicais livres que podem atacar órgãos e tecidos do organismo vivo (14).

2.3 Reação em cadeia após formação do radical livre

Entre os alvos habituais de ERO estão os ácidos gordos poli-insaturados (PUFAs) que são altamente suscetíveis a danos induzidos por ERO no local bis-alílico. Os PUFAs de cadeia longa mais abundantes no cérebro são o ácido araquidónico e o ácido docosahexaenóico (DHA), enquanto o ácido linoleico e o ácido α -linolénico são os principais precursores para a síntese de cadeia longa.

Os PUFAs ao possuírem um sítio bis-alílico são bastante propensos a danos induzidos por radicais livres ou espécies não radicais, desencadeando a oxidação não enzimática de lípidos, chamada de peroxidação lipídica. A remoção do hidrogénio alílico do PUFA inicia a peroxidação lipídica formando o radical lipídico centrado no carbono (L^{\bullet}). Na fase de propagação da reação em cadeia, L^{\bullet} reage rapidamente com o oxigénio molecular, levando à geração do radical peróxido lipídico (LOO^{\bullet}). O LOO^{\bullet} retira hidrogénio de outros lípidos insaturados, produzindo novos L^{\bullet} e hidroperóxidos lipídicos (LOOH). A peroxidação lipídica termina quando moléculas protetoras, como antioxidantes lipossolúveis, doam um átomo de hidrogénio ao LOO^{\bullet} , causando assim a formação de ERO menos reativas e, eventualmente, moléculas estáveis (15).

Resumindo, na peroxidação lipídica, a formação de radicais livres ocorre em vários passos e em cadeia (14):

1. *Reação de iniciação em cadeia de radical livre:* A origem de radicais livres numa reação inicia a reação em cadeia. Esta iniciação produz intermediários reativos.

2. *Propagação da cadeia:* Outro intermediário reativo é formado quando o intermediário interage com uma molécula estável, resultando outros radicais livres.

3. *Terminação em cadeia:* Pode haver várias reações colaterais que erradicam os intermediários reativos e, como resultado, a reação em cadeia é finalizada (Figura 2.2).

A propagação da peroxidação lipídica começa pela adição de oxigénio a estes radicais centrados em carbono. A propagação, na maioria das oxidações seguindo um mecanismo radical, ocorre numa taxa geralmente lenta e é representada pela transferência de um átomo de hidrogénio para a cadeia que carrega o radical peróxido lipídico. Os radicais livres de peróxido podem ser adicionados a ligações duplas carbono-carbono. Os dienos conjugados podem ser especialmente sujeitos à adição de peróxido. A substituição radical intramolecular no peróxido lipídico e reações de ciclização radicalar podem ocorrer, produzindo peróxidos cíclicos. Os antioxidantes podem reagir esgotando o oxigénio molecular ou diminuindo a sua concentração no local, removendo iões metálicos pró-oxidativos, aprisionando ERO agressivas, tais como o

radical anião superóxido ou peróxido de hidrogénio, eliminando radicais iniciadores de cadeia como hidroxilo (OH^\bullet), alcóxido (LO^\bullet) ou peróxido (LOO^\bullet), quebrar a cadeia de uma sequência radical ou eliminar o oxigénio singlete ($^1\text{O}_2$) (7).

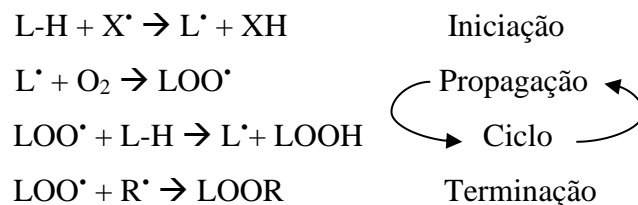


Figura 2.2 – Representação esquemática da formação de radicais livres e reações de terminação. L-H (ácido gordo poli-insaturado); L^\bullet (radical lipídico); LOO^\bullet (radical peróxido); LOOH (hidroperóxidos lipídicos). (Adaptado de (14)).

3. Antioxidantes

Os antioxidantes são moléculas com capacidade de metabolizar os radicais livres e, conseqüentemente, neutralizar os efeitos nocivos induzidos pelo stresse oxidativo (8).

A atividade antioxidante segue mecanismos baseado nas reações redox, ou seja, onde as reações de oxidação e redução ocorrem simultaneamente. As reações redox são muito comuns no nosso dia-a-dia, como tal, durante a ocorrência de várias reações fisiológicas no corpo humano, os radicais livres também são gerados como subprodutos inevitáveis, e em altas concentrações podem danificar estruturas celulares, ácidos nucleicos, lípidos e proteínas.

Para manter o equilíbrio redox nas células de organismos aeróbios, estes possuem sistemas antioxidantes integrados, que incluem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para que ocorra a neutralização de radicais livres, ERO ou ERA (16). Esta neutralização pode ser realizada de várias formas, tais como eliminação direta de radicais livres, ativação de enzimas antioxidantes, agentes quelantes e inibição de oxidases (14).

3.1 Classificação dos antioxidantes

3.1.1 Antioxidantes primários e secundários

Os antioxidantes são classificados como antioxidantes primários ou secundários de acordo com os seus mecanismos de atuação. Os antioxidantes primários, os chamados antioxidantes de quebra de cadeia, são aceitadores de radicais livres que atrasam a etapa de iniciação ou interrompem a etapa de propagação da oxidação. No decorrer do processo de neutralização, o antioxidante perde um elétron e transforma-se num radical (17), neste sentido, agem pela

eliminação de espécies radicais, convertendo-os em radicais mais estáveis ou em espécies não radicalares (18).

Os antioxidantes secundários ou preventivos atuam através de vários mecanismos. Estes antioxidantes têm a capacidade de diminuir a taxa de oxidação, mas não são capazes de converter espécies reativas em produtos mais estáveis. Este tipo de antioxidante pode formar complexos com metais pró-oxidantes e desativá-los, decompor peróxidos em espécies não radicalares, eliminar o oxigénio singlete, inibir enzimas oxidativas, por exemplo, lipoxigenase e absorver radiação UV (17)(18).

3.1.2 Antioxidantes endógenos e exógenos

Os antioxidantes neutralizam radicais livres e oxidantes e podem ser classificados de acordo com a sua fonte, podem ser endógenos (enzimas e pequenas moléculas) ou exógenos (flavonoides, ácidos fenólicos, carotenoides, vitaminas e minerais) (19).

O sistema antioxidante endógeno consiste em antioxidantes enzimáticos e em antioxidantes não enzimáticos (19). Já o sistema antioxidante exógeno consiste apenas em antioxidantes não enzimáticos que não podem ser sintetizados no corpo humano e são retirados da dieta e de suplementos alimentares, tais como vitamina C, vitamina E, carotenoides, alguns minerais (por exemplo, zinco, magnésio, cobre, selénio) e polifenóis (flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos). Os antioxidantes exógenos estão presentes em quantidades significativas em frutas, vegetais, bebidas (sumos, chá, café), nozes e cereais comumente consumidos (18)(20).

3.1.3 Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos

3.1.3.1 Antioxidantes enzimáticos endógenos

Existem várias enzimas que catalisam reações para neutralizar os radicais livres e ERO. Essas enzimas formam os mecanismos de defesa endógena do corpo contra os radicais livres para proteger a célula (21). Os antioxidantes enzimáticos incluem catalase (CAT), família superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e tioredoxina (Trx). O SOD pode catalisar a transformação de superóxido (O_2^-) em oxigénio (O_2) e peróxido de hidrogénio (H_2O_2). A CAT pode catalisar a passagem do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em oxigénio molecular (O_2) e água (H_2O) (Figura 3.1) (16)(19).

SOD parece ser a primeira linha de defesa contra os radicais livres derivados de oxigénio e pode ser rapidamente induzida nalgumas condições quando exposta ao stresse oxidativo (19). A família SOD contém isoformas que diferem em relação ao ião metálico no centro ativo e os

compartimentos celular onde se encontra. SOD com cobre e zinco (Cu/Zn) no centro ativo está presente no citosol (SOD1) e no espaço extracelular (SOD3), enquanto o SOD presente nas mitocôndrias possui manganês no sítio ativo (Mn; SOD2). No entanto, apenas Mn-SOD é essencial para a sobrevivência da vida nas condições aeróbias. CAT é uma proteína homotetramérica contendo heme com um íon de ferro no centro ativo (16).

GPxs pertencem a uma família de enzimas filogeneticamente relacionadas. A família GPx consiste em três grupos evolutivos: GPx1/GPx2, GPx3/GPx5/GPx6 e GPx4/GPx7/GPx8. GPxs pode usar glutatona como um redutor para catalisar as reações de H₂O₂ ou hidroperóxidos orgânicos em água ou os álcoois correspondentes, respetivamente. Membros de GPxs têm função antioxidante em diferentes compartimentos celulares, GPx1 está presente de forma ubíqua no citosol e mitocôndria, GPx2 no citosol e núcleo e GPx3 no plasma, GPx4 está associado à membrana e parece proteger as membranas do desafio oxidativo (19).

O sistema antioxidante endógeno Trx é constituído por Trx, selenoenzima tiorredoxina redutase (TrxR) e nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) que funciona como o dador de eletrões para o sistema (19).

As TrxR são proteínas homodiméricas em que cada monómero inclui um grupo prostético dinucleótido de flavina e adenina (FAD), um local de ligação NADPH e um centro ativo contendo um dissulfeto redox. No caso da TrxR dos mamíferos, para além do dissulfeto redox (Cisteína (Cys) 64 e Cys 59) no terminal N, existe na região terminal C uma Cys extra (Cys 497) e um resíduo de selenocisteína (Sec 498) que é muito reativo e essencial para a atividade catalítica. Os eletrões são transferidos do NADPH via FAD para o dissulfeto do centro ativo e depois para o selenol-tiol que então reduz o substrato (22).

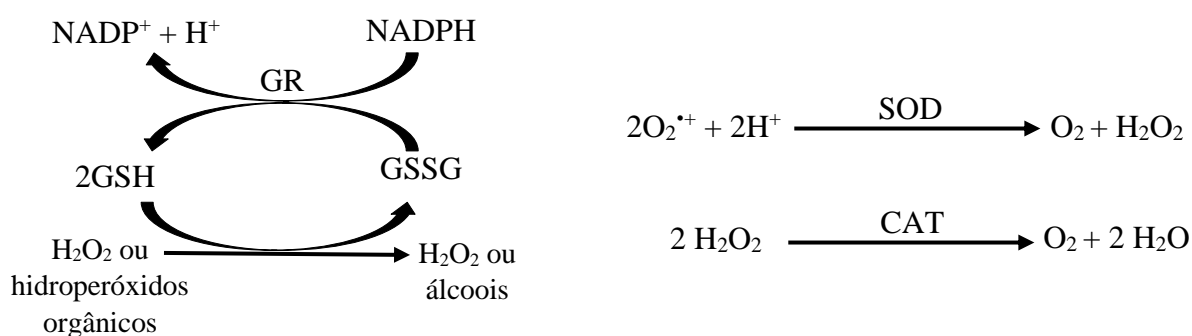


Figura 3.1 - Mecanismo seguido por enzimas antioxidantes. GSH (glutationa reduzida); GSSG (glutationa oxidada); GR (glutationa redutase); SOD (superóxido dismutase); CAT (catalase); NADPH (nicotinamida adenina dinucleotido fosfato). (Adaptado de (18)).

3.1.3.2 Antioxidantes não enzimáticos endógenos

Os antioxidantes não enzimáticos endógenos incluem proteínas de ligação a metais, glutatona, ácido úrico, melatonina, bilirrubina e poliaminas. Devido à sua localização, essas proteínas e substâncias de baixo peso molecular fornecem mecanismos eficazes de defesa intracelular ou extracelular contra ERO e ERA (20).

3.1.3.2.1 Proteínas de ligação a metais

Os primeiros antioxidantes endógenos descritos foram as proteínas de ligação a metais (PLMs), ou seja, proteínas extra e intracelulares, como albumina, ceruloplasmina, metalotioneínas, ferritina, mioglobina, transferrina e lactoferrina. PLMs são os principais contribuintes para a capacidade antioxidante do plasma. As suas propriedades antioxidantes envolvem a capacidade de ligar íons metálicos (Cu^{2+} e Fe^{2+}) que podem ser extremamente pró-oxidantes, o que significa que eles podem reagir com peróxido de hidrogénio e catalisar a formação de ERO na reação de Fenton (20). O papel do ferro nas reações metabólicas está associado às suas propriedades químicas específicas. Geralmente ocorre em dois estados de oxidação (Fe^{2+} e Fe^{3+}), portanto, o ferro pode ser um doador e um aceitador de elétrons. Devido à atividade redox, o ferro pode participar em várias reações biológicas redox-dependentes no corpo humano (20).

PLMs como transferrina, ferritina e lactoferrina são quelantes de ferro redox-ativo (Fe^{2+}), que podem ser inibidores de radicais livres eficazes na reação de Fenton (20).

A transferrina é considerada um antioxidante devido à sua capacidade de reduzir a concentração de íons ferrosos livres, que catalisam a conversão do peróxido de hidrogénio em radical hidroxilo, altamente tóxico durante a reação de Fenton (Figura 3.2).

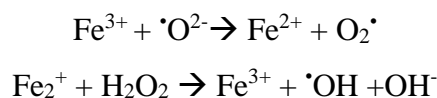


Figura 3.2 - Reação de Fenton.

Em contraste à transferrina, a ceruloplasmina (glicoproteína de alto peso molecular constituída por mais de mil aminoácidos) atua como um inibidor de espécies reativas ligando-se a íons cobre livre (Cu^{2+}) e íons de ferro (Fe^{2+}) ou como um antioxidante de quebra de cadeia (20).

A mioglobina é uma proteína heme citosólica é composta por cento e cinquenta aminoácidos. Estudos recentes demonstraram que a mioglobina pode atuar como um eliminador

do radical livre de monóxido de azoto (NO^{*}) e também é capaz de reduzir o stresse oxidativo eliminando ERO, especialmente de peróxido de hidrogénio (23).

As metalotioneínas são proteínas intracelulares de baixo peso molecular ricas em cisteína. A atividade redox das metalotioneínas foi atribuída aos ligantes tiolato presentes nos resíduos de cisteína, esses resíduos são reativos contra oxidantes celulares. Esta inativação de espécies oxidativas é acompanhada pela libertação de zinco dos complexos metal-tiolato, diminuindo a peroxidação lipídica. As metalotioneínas são capazes de eliminar os radicais hidroxilo e o radical anião superóxido, peróxido de hidrogénio, ERA e radicais NO. Além disso, também apresentam capacidade de quelar metais pesados como mercúrio e cádmio, diminuindo a toxicidade aguda desses metais (18).

Por sua vez, a albumina é uma proteína antioxidante multifuncional, que se liga aos metais redox (Fe²⁺ e Cu²⁺) e também pode atuar reagindo com radicais hidroxilo. Iões ferrosos e cúpricos livres são catalisadores na reação de Fenton, na qual radicais hidroxilo são gerados. Normalmente, esses iões metálicos estão ligados a proteínas. O cobre, por exemplo, possui alta afinidade com a ceruloplasmina, mas, por vezes, liga-se à albumina. Aproximadamente 40-70% da atividade antioxidante total da albumina sérica humana está associada a aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína e, portanto, é uma excelente armadilha para radicais livres (20). É o grupo tiol exposto no resíduo de cisteína livre que permite que a albumina elimine os radicais hidroxilo (24). As propriedades antioxidantes da albumina derivam também do seu efeito indireto, associado à ligação da bilirrubina e de ácidos gordos insaturados, que previne a oxidação desses compostos (25). A função antioxidante da albumina resulta da sua capacidade de captura de radicais livres e várias propriedades de ligação de ligantes. A albumina é considerada a principal molécula extracelular responsável por manter o estado redox plasmático (20).

3.1.3.2.2 Coenzima Q₁₀

Coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀), também designada de ubiquinona (2,3 dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-1,4-benzoquinona) é uma pequena estrutura lipofílica, composta por um anel de benzoquinona e uma cadeia lateral isoprenoíde e é encontrada universalmente nas membranas celulares (26). A CoQ₁₀ é amplamente distribuída em todas as membranas celulares e está envolvida na cadeia de transporte de eletrões (CTE) que transporta eletrões entre os complexos I/II e III (27).

A principal função da ubiquinona está na CTE mitocondrial. CoQ10 aceita elétrons de diferentes doadores, incluindo complexo I (NADH-coenzima Q oxidorreductase), complexo II (succinato desidrogenase), a oxidação de ácidos gordos e aminoácidos de cadeia ramificada via desidrogenases ligadas a flavina e fator de transferência de elétrons Q oxidorreductase (FTE-QO) em complexo III (ubiquinona-citocromo c oxidoreductase). A CoQ10 faz um ciclo entre as suas três formas químicas: completamente oxidado (ubiquinona), um radical livre intermediário semi-oxidado (semiquinona) e uma forma completamente reduzida (ubiquinol), conforme mostrado na Figura 3.3 (26). CoQ₁₀ exibe a sua atividade na fase lipídica e participa das reações redox de desidrogenases, citocromos ou outras proteínas não heme. Essas propriedades são demonstradas apenas pela forma reduzida de CoQ₁₀, ou seja, o ubiquinol (CoQ₁₀H₂) e radical semiquinona (CoQ₁₀H). Ubiquinol permite a ligação do hidrogénio aos radicais livres, o que leva à transformação do ubiquinol e à formação do radical semiquinona (CoQ₁₀H). O radical formado nesta reação também demonstra propriedades antioxidantes e pode reagir com o oxigénio molecular e outros radicais livres (20).

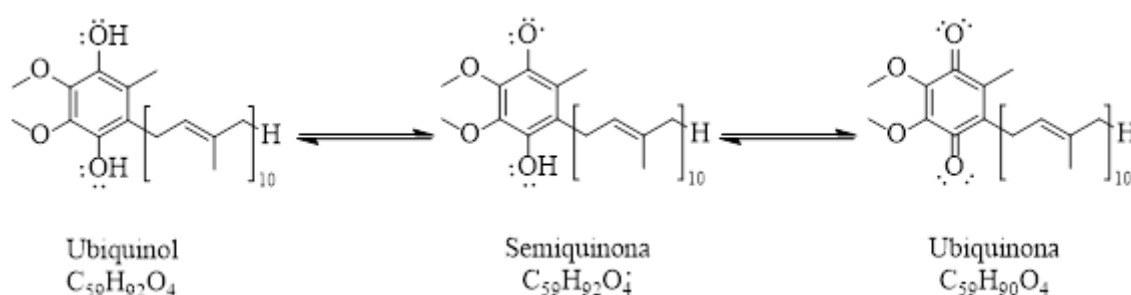


Figura 3.3 - Formas redox da CoQ10 ubiquinona (forma oxidada), ubiquinol (forma reduzida) e semiquinona (semi-oxidada). O ciclo Q dentro da membrana da matriz permite a transferência de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana ajudando a gerar o gradiente eletroquímico para a produção de ATP. (Adaptado de (26)).

3.1.3.2.3 Glutathiona

A glutathiona é um composto de baixo peso molecular composto por três aminoácidos: glicina, cisteína e ácido glutâmico. A glutathiona está presente em várias formas redox, entre as quais as mais importantes são a glutathiona reduzida (GSH) e a glutathiona oxidada (GSSG). GSH é um antioxidante solúvel que está presente no citoplasma, mitocôndria e núcleo e desempenha um papel importante como eliminador de radicais livres e atua também como cofator para várias enzimas, incluindo GPx, glutathiona redutase (GR) e glutathiona transferase (GST) (21).

As propriedades antioxidantes da GSH dependem da presença de uma ligação pseudo-

peptídica entre o grupo amino da cisteína e o grupo α -carboxilo, proporcionando uma excelente proteção contra aminopeptidases e da expressão do grupo tiol (-SH) derivado do resíduo de cisteína. Devido à presença deste grupo tiol na molécula, a GSH tem a capacidade de proteger outros grupos tiol nas proteínas contra o dano oxidativo. Os grupos tiol estão entre as espécies químicas mais reativas que ocorrem nas células (20). Como antioxidante, a GSH reduz as ERO durante as reações enzimáticas e não enzimáticas. A GSH pode manter antioxidantes exógenos importantes, como as vitaminas C e E, no seu estado reduzido. A glutatona pode regenerar a vitamina C tanto do radical ascorbilo quanto do desidroascorbato, e pode regenerar a vitamina E do radical cromanoílo (18). A GSH também está envolvida na reparação de moléculas de proteínas, ácidos nucleicos e lípidos danificados em processos de peroxidação e na manutenção de grupos sulfidrilo de proteínas em estado reduzido (20).

3.1.3.2.4 Ácido lipoico

O ácido lipoico é um ácido gordo com oito átomos de carbono e apresenta enxofre na sua estrutura que contribui na reação que catalisa a oxidação e descarboxilação de α -cetoácidos, por exemplo, piruvato e α -cetogluturato, no ciclo do ácido cítrico. O ácido lipoico e a sua forma reduzida, o ácido di-hidrolipoico (ADHL), são capazes de eliminar os radicais livres nos domínios lipídico e aquoso. Foi revelado que o ácido lipoico e o ADHL têm propriedades farmacológicas antioxidantes, cardiovasculares, anti-envelhecimento, desintoxicantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e neuroprotetoras (21).

O ácido lipoico exerce a sua atividade antioxidante através da eliminação de ERO mas também por quelação de metais de transição. O ácido lipoico apresenta alta atividade eliminatória principalmente contra o ácido hipocloroso enquanto o ADHL diminui a atividade pró-oxidativa do ferro e cobre não ligados. Acredita-se que o ácido lipoico suprima o mecanismo de reação do tipo Fenton - a formação subsequente de OH^{\bullet} (18).

3.1.3.2.5 Ácido úrico

O ácido úrico (AU) é um dos compostos orgânicos de baixo peso molecular que são gerados durante o metabolismo das purinas. O ácido úrico é um antioxidante hidrofílico, sendo responsável por cerca de 60% da capacidade de eliminação de radicais livres do plasma. O AU é um eliminador de várias ERO, por exemplo, peroxinitrito, radical hidroxilo, oxigénio singlete e peróxidos lipídicos. Além disso, o AU contribui para a proteção de enzimas antioxidantes como a SOD1 e SOD3. Estudos relataram que o urato tem a capacidade de eliminar os radicais livres e proteger a membrana dos eritrócitos da oxidação lipídica (18).

3.1.3.2.6 Melatonina

A melatonina é uma indolamina com duas cadeias laterais, um grupo 5-metoxilo e um grupo 3-amida, produzida endogenamente (28). A melatonina pode facilmente ultrapassar as membranas celulares e a barreira hematoencefálica e protege várias biomoléculas contra danos causados por radicais livres, agindo como um eliminador direto de ERO e ERA. Além disso, a melatonina pode reduzir indiretamente o stresse oxidativo, aumentando as atividades dos sistemas de defesa antioxidante; estimular a expressão e função de várias enzimas antioxidantes, e aumentar a eficiência da CTE mitocondrial. Também apresenta uma propriedade quelante que pode contribuir na redução da toxicidade induzida por iões metálicos e apresenta uma capacidade de eliminar radicais livres, incluindo radicais hidroxilo, radicais peróxilo, oxigénio singlete, monóxido de azoto, peroxinitrito e peróxido de hidrogénio (29).

Vários metabolitos da melatonina são também eliminadores de radicais como, por exemplo, 3-hidroximelatonina cíclica (c3OHM), N(1)-acetil-N(2)-formil-5-metoxiquinuramina (AFMK) e N1-acetil-5-metoxiquinuramina (AMK) (30).

A doação de eletrões é o principal mecanismo pelo qual a melatonina elimina os radicais livres. Depois de doar um eletrão para o OH^{*}, a melatonina torna-se num radical livre, o catião do radical indolilo. No entanto, a sua reatividade é muito baixa e, portanto, não é tóxico para as células. As ERA representam outra categoria de substâncias potencialmente destrutivas, que reagem com a melatonina. O peroxinitrito (ONOO^{*}) em si é uma espécie muito prejudicial, capaz de reagir com proteínas, lípidos e ADN. A melatonina combina-se prontamente com um superóxido libertando NO, evitando assim a formação de ONOO^{*} (29).

A melatonina tem ações importantes ao nível das mitocôndrias pois aumenta a eficiência da CTE e, portanto, reduz a saída de eletrões e a formação de radicais livres que é uma consequência do processo respiratório por estimular o complexo I e o complexo IV da cadeia respiratória mitocondrial (29)

Relativamente aos metais, a melatonina é capaz de prevenir as ações oxidativas dos mesmos, neutralizando as ERO produzidas e capturando tais metais para formar quelatos. A melatonina quelata tanto o Fe³⁺ quanto o Fe²⁺, que é a forma que acompanha a reação de Fenton (31).

3.1.3.2.7 Bilirrubina

A bilirrubina é um produto da degradação da hemoglobina e outras proteínas heme pelo

sistema fagocitário mononuclear. Consiste numa estrutura tetrapirrólica de cadeia aberta. Após a dissolução dos eritrócitos, o resíduo heme da hemoglobina é enzimaticamente decomposto em biliverdina pela heme oxigenase e, subsequentemente, a biliverdina é reduzida a bilirrubina pela biliverdina redutase. Este processo é reversível e a oxidação da bilirrubina resulta na formação de biliverdina. (18)

Estudos experimentais mostraram que a bilirrubina tem propriedades antioxidantes, como sequestrar ERA e inibir a atividade da NADPH oxidase, resultando numa diminuição do stresse oxidativo. Foi demonstrado em estudos *in vitro* que a bilirrubina não conjugada ligada à albumina é oxidada por anião radical superóxido, radicais hidroxilo e radical hidroperoxilo ou superóxido de hidrogénio e que a bilirrubina não conjugada protege a albumina da oxidação pelos mesmos radicais e por peroxinitrito, indicando que a bilirrubina não conjugada pode servir como um antioxidante através da eliminação direta de ERO. Além disso, foi demonstrado que a bilirrubina inibe a atividade da NADPH oxidase, sugerindo que a produção de ERO é diminuída pela bilirrubina. (32)

3.1.3.2.8 Poliaminas

Poliaminas (PAs) como espermidina, espermina e putrescina (Figura 3.4) atuam como antioxidantes e eliminadores de radicais livres (33). Estas PAs demonstram propriedades antioxidantes contra o peróxido de hidrogénio nas hemácias e suprimem e diminuem a hemólise dos eritrócitos. Esse efeito protetor das PAs é atribuído à estabilização dos lípidos nas membranas citoplasmáticas. As PAs protegem as membranas celulares do peróxido de hidrogénio, anião radical superóxido e radicais peroxilo e radicais peroxilo derivados de fosfolípidos poli-insaturados. Fosfolípidos carregados negativamente contidos nas membranas celulares podem reagir com grupos amino carregados positivamente. A espermina devido a quatro grupos amino é um eliminador mais eficaz do que a espermidina e a putrescina (34).

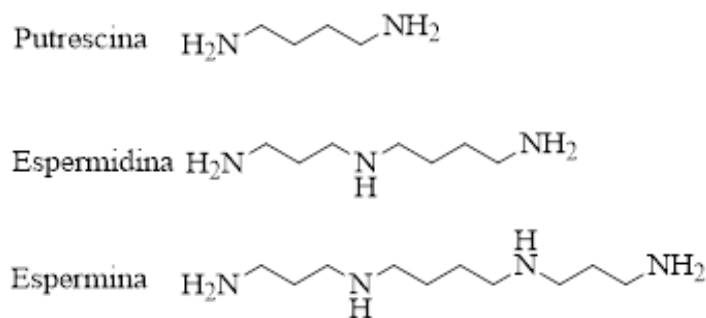


Figura 3.4 – Exemplos de poliaminas.

3.1.3.3 Antioxidantes não enzimáticos exógenos

Antioxidantes não enzimáticos exógenos incluem antioxidantes dietéticos (21).

3.1.3.3.1 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico ou vitamina C, uma vitamina hidrossolúvel essencial para humanos, participa da reparação dos tecidos, garantindo o funcionamento da pele, tendões, ligamentos e vasos sanguíneos. Está envolvido na cicatrização de feridas, bem como na manutenção da cartilagem, ossos, dentes e melhora a absorção de ferro (21).

Nos organismos, a vitamina C pode ser encontrada na sua forma reduzida (ácido ascórbico ou ascorbato) ou na sua forma oxidada, ácido desidroascórbico (ADA) (Figura 3.5), que é um produto da oxidação do ácido ascórbico. A vitamina C tem atividades fisiológicas e metabólicas essenciais em humanos, mas só é obtida através da dieta (humanos não possuem a enzima L-gulono-1,4 lactona oxidase, essencial para a sua produção) (35).

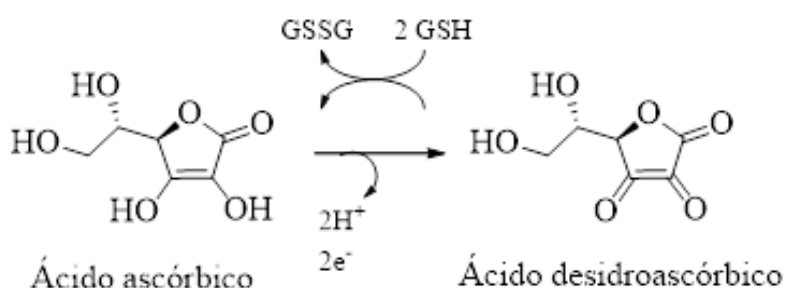


Figura 3.5 – Ácido ascórbico e a sua forma oxidada, ácido desidroascórbico

A vitamina C está localizada na fase aquosa das células, representando um excelente doador de elétrons, que converte radicais em espécies estáveis (21), demonstrando assim ser um eliminador eficaz de ERO e ERA. Além disso, a vitamina C é eficaz na regeneração da forma antioxidante oxidada (radical) da vitamina E, reduzindo os radicais tocoferoxilo à forma nativa. Este processo protege as membranas e outros compartimentos da célula de danos

induzidos por radicais livres (36). No processo de regeneração da forma reduzida de tocoferol pela doação de hidrogénio, o ácido ascórbico é convertido no radical semi-hidroascorbilo e depois em ácido desidroascórbico. O semidesidroascorbato pode ser reduzido a ascorbato pelo citocromo b5 redutase e tioredoxina redutase em reações que requerem NADH ou NADPH como coenzimas. O desidroascorbato é reduzido por GSH, assim como em reações enzimáticas usando GSH ou NADPH. Embora a vitamina C reduza muitas ERO, ela também pode reduzir os iões metálicos (iões férricos para iões ferrosos e iões cúpricos para iões cuprosos) que promovem a geração de radicais livres em sistemas Fenton (18).

3.1.3.3.2 Vitamina E

Os tocoferóis são compostos estruturalmente monofenólicos, apresentando um anel cromanol, e representam uma importante classe de antioxidantes lipossolúveis. Este grupo de compostos genericamente conhecido como vitamina E, é a família mais importante de antioxidantes que protegem os lípidos da membrana (37).

A vitamina E é quimicamente representada por oito isoformas: quatro tocoferóis ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) e quatro tocotrienóis ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$) e a diferença entre eles está na saturação da cadeia lateral; os tocoferóis têm uma cadeia saturada e os tocotrienóis têm uma cadeia insaturada com 3 ligações duplas (Figura 3.6). É encontrado em alimentos como gérmen de trigo e girassol, cártamo, milho e óleos de soja. A vitamina E é conhecida como α -tocoferol porque é a isoforma mais abundante na natureza (38).

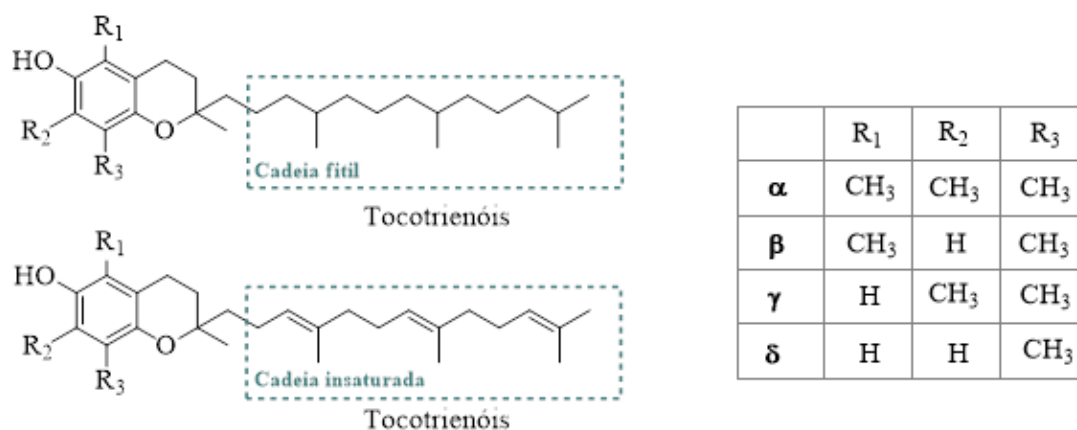


Figura 3.6 – Estruturas químicas das oito isoformas de vitamina E. (Adaptado de (37)).

O α -tocoferol também conhecida por vitamina E é a principal forma dotada de propriedades antioxidantes (eliminação de radicais livres) e função imunológica. O α -tocoferol foi confirmado como um inibidor eficaz da propagação da reação em cadeia da peroxidação

lipídica (37). Os tocoferóis representam doadores de hidrogénio eficazes para os radicais alquila ou alquil-peroxilo, dando origem ao radical tocoferoxilo correspondente, enquanto a forma reduzida pode ser regenerada pelo ácido ascórbico. Quando presente em níveis elevados, o radical tocoferoxilo pode retirar hidrogénio do substrato lipídico, produzindo tocoferol e um radical lipídico. Este radical lipídico resultante pode aumentar a oxidação lipídica ao reagir com o oxigénio tripleto e, nesta situação, o tocoferol atua como pró-oxidante em vez de antioxidante. A peroxidação mediada por tocoferol pode ser prevenida pelo ácido ascórbico, que reduz rapidamente os radicais de tocoferoxilo (18).

A vitamina E é um antioxidante lipofílico e protege os PUFAs, especialmente o DHA, um PUFA altamente oxidável, que provém da peroxidação lipídica. Esta vitamina é parte integrante de uma rede antioxidante que envolve também a vitamina C, a GSH e o potencial redutor endógeno do NADPH (Figura 3.7). A rede é iniciada com a formação de um radical tocoferoxilo, o produto da oxidação da vitamina E por um radical peroxilo solúvel em lípidos. O radical tocoferoxilo é reduzido pelo ácido ascórbico, que regenera o α -tocoferol. A redução do radical ascorbato utiliza outros antioxidantes, especialmente GSH formando GSSG, o produto de oxidação de GSH. A redução subsequente de GSSG por GR usa equivalentes redutores endógenos, principalmente NADPH. Devido à rede antioxidante, a vitamina E é um potente antioxidante lipofílico necessário para proteger as membranas ricas em PUFA do tecido nervoso, eritrócitos e outros tecidos e tipos de células (37).

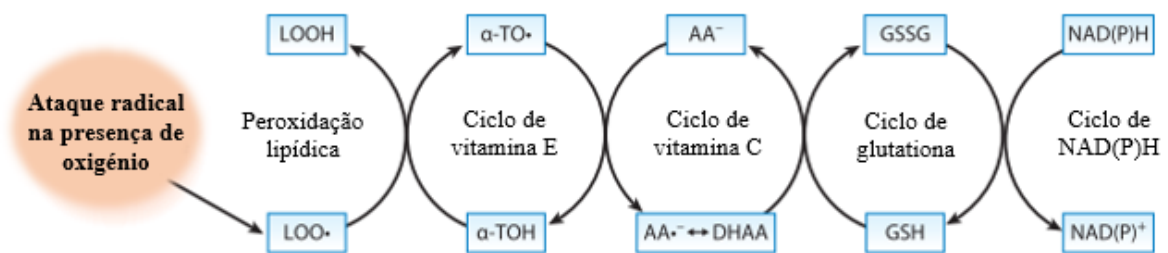


Figura 3.7 - A interação da peroxidação lipídica com antioxidantes: a rede antioxidante. (Adaptado de (37)).

3.1.3.3.3 Carotenoides

Os carotenoides são pigmentos naturais estrutural e funcionalmente diferentes encontrados em muitas frutas e vegetais (21). Os carotenoides são terpenoides lipossolúveis e incluem carotenos (β -caroteno e licopeno) que são hidrocarbonetos polieno e também incluem xantofilas (luteína, capsantina, astaxantina, violaxantina) que apresentam grupos oxigenados (hidroxilo, oxo- ou epóxilo) (Figura 3.8). As características antioxidantes dos carotenoides

incluem eliminação de oxigênio singlete, radicais peróxido, radicais sulfonilo, tiolo e NO_2 , conferindo proteção aos lipídios contra o ataque dos radicais hidroxilo e superóxido (18). A presença de carotenoides aumenta o poder antioxidante dos tocoferóis na fase lipídica das membranas biológicas (21).

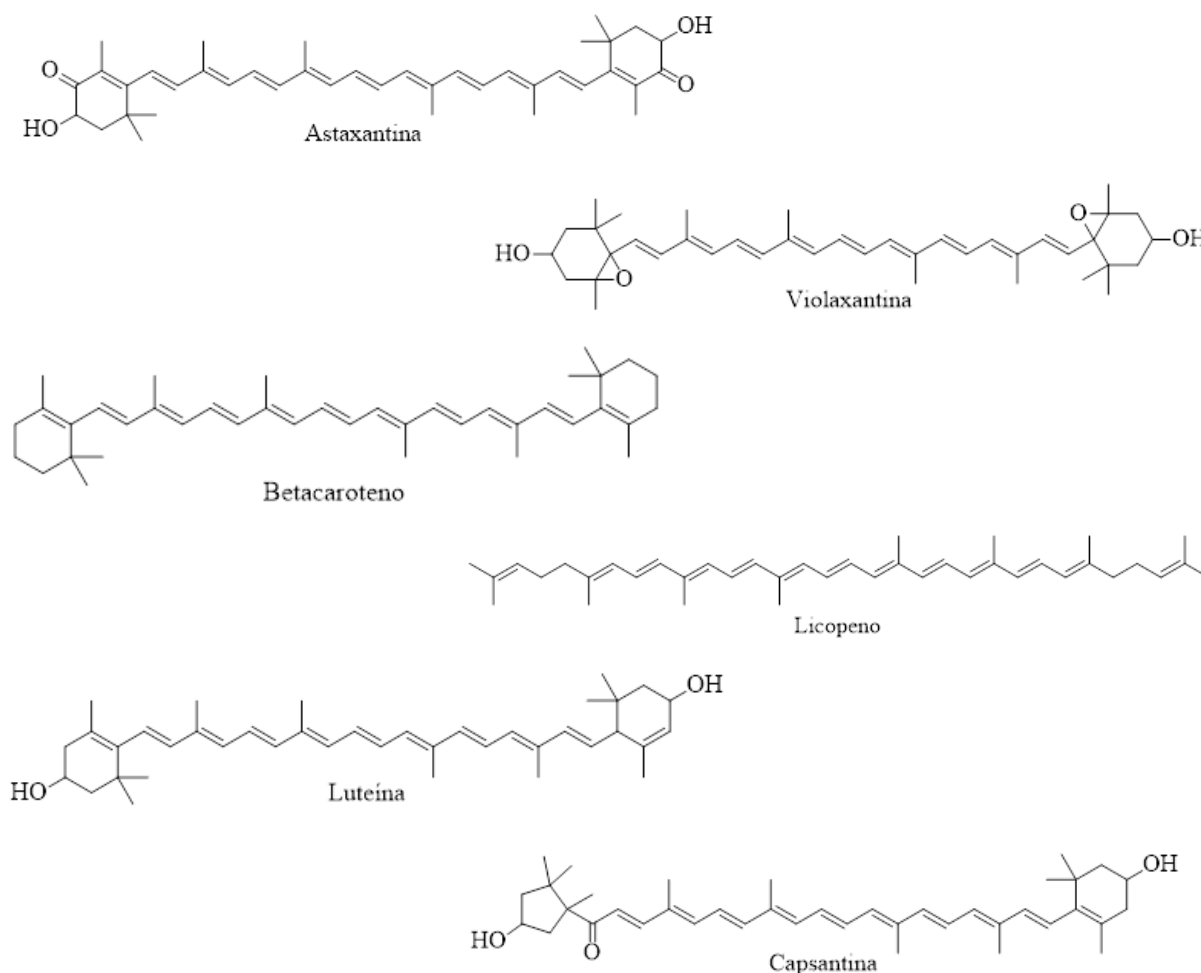


Figura 3.8 – Estruturas químicas de carotenoides.

3.1.3.3.4 Vitamina A

A vitamina A é uma vitamina lipossolúvel que não pode ser sintetizado pelo corpo humano e deve ser obtido na dieta. Está disponível em ovos, óleos de peixe, fígado, laticínios, frutas amarelas e laranja e vegetais de folhas verde-escuras. O cozimento moderado de vegetais aumenta a liberação de carotenoides, permitindo uma maior absorção (39).

A vitamina A pode ser encontrada sob duas formas: a vitamina A pré-formada ou retinol (de origem animal) e a pró-vitamina A ou carotenoides (de origem vegetal)(40)(41).

O retinol pode ser convertido pelo corpo em retinal, que por sua vez pode ser oxidado

em ácido retinoico, a forma de vitamina A conhecida por regular a transcrição do gene. Retinol, retinal, ácido retinoico e compostos relacionados são conhecidos como retinoides (41).

O β -caroteno, o caroteno mais abundante e conhecido, e outros carotenoides alimentares são precursores da vitamina A, podendo ser convertidos pelo corpo em retinol, deste modo, os carotenoides são referidos como pró-vitamina A (41).

Uma das formas mais ativas de vitamina A é *trans*-retinol (Figura 3.9) que contém cinco ligações duplas conjugadas localizadas num anel de ciclohexenil, bem como cadeias laterais específicas de isoformas. De acordo com a literatura, o *trans*-retinol pode atuar como um antioxidante de quebra de cadeia na eliminação eficaz do radical lipoperoxilo em solução. Um estudo (42) reavaliou especificamente o que é proposto para o *trans*-retinol como um antioxidante de quebra de cadeia na eliminação eficaz do radical peroxilo numa solução, e também o que se propõe para a vitamina A como pró-oxidante. As propriedades de eliminação de radicais de *trans*-retinol foram avaliadas na fase gasosa e no solvente éter dietílico. Com base nos dados obtidos, os autores deste estudo concluíram que o retinol atua como um bom doador de elétrons, mas um mau aceitador de elétrons na interação com o radical peroxilo (42).

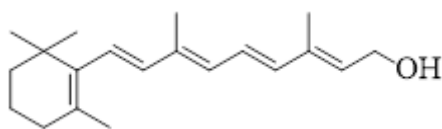


Figura 3.9 – Estrutura química de *trans*-retinol.

3.1.3.3.5 Compostos fenólicos

Flavonoides (flavonas, flavonóis, flavonóides, flavanonas, isoflavonas, antocianinas) e não flavonoides (ácidos fenólicos, derivados de estilbeno, lenhanos) têm uma capacidade confirmada de reduzir os efeitos dos radicais livres. Compostos fenólicos e flavonoides naturais são metabolitos secundários de plantas e organismos marinhos que contêm um anel aromático contendo pelo menos um grupo hidroxilo. Os compostos fenólicos são bons doadores de elétrons porque os seus grupos hidroxilo podem contribuir diretamente para a ação antioxidante. Além disso, alguns deles estimulam a síntese de moléculas antioxidantes endógenas na célula. De acordo com vários relatos na literatura, os compostos fenólicos exibem inibição de radicais livres, decomposição de peróxidos, inativação de metais ou eliminação de oxigênio em sistemas biológicos e previnem a carga de doenças oxidativas (43).

3.1.3.3.5.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos são divididos principalmente em dois subgrupos: ácido hidroxibenzoico e ácido hidroxicinâmico (Figura 3.10) (19). Ácidos hidroxicinâmicos possuem uma estrutura comum de C₆-C₃ e são derivados do ácido cinâmico, presentes nos alimentos frequentemente como ésteres simples com ácido quínico ou glicose. Os quatro ácidos hidroxicinâmicos mais comuns são os ácidos ferúlico, caféico, *p*-cumárico e sinápico (19).

Os ácidos hidroxibenzoicos possuem uma estrutura comum de C₆-C₁ e são derivados do ácido benzóico. Em comparação com os ácidos hidroxicinâmicos, os ácidos hidroxibenzoicos são geralmente encontrados em baixa concentração em frutas vermelhas, cebolas e rabanete preto. Os quatro ácidos hidroxibenzoicos comumente encontrados são os ácidos *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico (44).

Os compostos fenólicos são conhecidos como antioxidantes diretos, no entanto, também mostraram atividade antioxidante indireta pela indução de enzimas protetoras endógenas. Os ácidos fenólicos atuam como antioxidantes (devido à reatividade da parte fenólica; substituinte hidroxilo no anel aromático). Embora vários mecanismos sejam conhecidos para a atividade antioxidante (devido à reatividade da parte fenólica) dos ácidos fenólicos, acredita-se que a eliminação de radicais através da doação de átomos de hidrogénio seja o método principal (44).

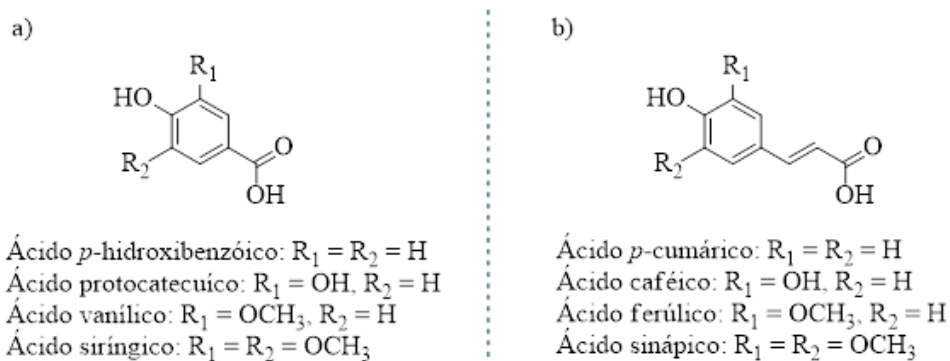


Figura 3.10 – a) Estrutura química dos derivados do ácido hidroxibenzoico; b) estrutura química dos derivados do ácido hidroxicinâmicos.

3.1.3.3.5.1.1 Flavonoides

Os flavonoides são uma ampla classe de compostos fenólicos de baixo peso molecular encontrados nas plantas, caracterizados pelo núcleo flavano. As antocianina são pigmentos presentes nas flores de algumas espécies vegetais que atraem insetos polinizadores e são responsáveis pelas cores vermelhas e azuis características de frutas vermelhas, vinhos e certos vegetais e principais fontes de flavonoides na dieta humana (45).

Estruturalmente, os flavonoides são compostos por dois anéis de benzeno (A e B) ligados entre si por uma pirona heterocíclica (C) (Figura 3.11) e são classificados de acordo com as substituições nos anéis (Figura 3.12) (46).

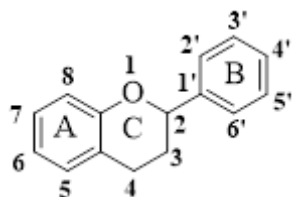


Figura 3.11 – Estrutura nuclear dos flavonoides

Classe	Estrutura geral
Flavanol	
Flavona	
Flavonol	
Flavanona	
Isoflavona	
Antocianidina	

Figura 3.12 – Estrutura química dos flavonoides e respetiva classe.

Flavonoides dietéticos diferem nos arranjos dos grupos laterais hidroxilo, metoxi- e glicosídico nos anéis A e B (45). A configuração e o número total de grupos hidroxilo influenciam substancialmente o mecanismo da atividade antioxidante e é possível afirmar que a hidroxilação do anel B é o determinante mais significativo na eliminação de ERO (19). Os efeitos protetores dos flavonoides são atribuídos à sua capacidade de transferir radicais livres de elétrons, catalisadores de metal quelato, ativar enzimas antioxidantes, reduzir radicais α -tocoferoxilo e inibir oxidases (45).

3.1.3.3.6 Minerais

Os minerais são uma pequena proporção dos antioxidantes dietéticos. Os minerais mais importantes com função antioxidante são o selénio e o zinco. O zinco exerce funções múltiplas, estando envolvido na catálise enzimática e na mediação de sinais em sistemas biológicos. O zinco atua como componente vital nos sistemas redox pois é um componente da SOD, aumenta a expressão da metalotioneína e compete com o ferro e o cobre na membrana celular, contribuindo para a inibição da NADPH oxidase, diminuindo assim a produção de anião radical superóxido e peróxido de hidrogénio, pois NADPH atua como um doador de eletrões (19)(18).

O selénio é reconhecido como um oligoelemento essencial que desempenha um papel importante no sistema antioxidante como um componente da GPx dependente de selénio. O selénio também aumenta as ações da vitamina E na redução dos radicais peróxidos (47).

3.1.4 Linhas de defesa

Os antioxidantes podem ser classificados em quatro categorias de acordo com o seu papel desempenhado no sistema de defesa que é ativado contra o stresse oxidativo.

Quatro linhas de defesa foram identificadas, com base na sua reatividade: antioxidantes preventivos, eliminadores de radicais, antioxidantes de reparação e antioxidantes que dependem de mecanismos de adaptação (48). A primeira linha de defesa é composta por antioxidantes que previnem processos oxidativos, suprimindo a formação de espécies radicais. Estes antioxidantes atuam muito rapidamente e neutralizam qualquer radical livre que possa induzir a produção de outros radicais ou qualquer espécie química que tenha o potencial de ser convertida num radical livre, ou seja, dismutam o radical anião superóxido, decompõem o peróxido de hidrogénio e os hidroperóxidos dando origem a espécies inofensivas (por exemplo, oxigénio molecular). Esta primeira linha de defesa também inclui proteínas de ligação a iões metálico, tais como, lactoferrina, ferritina e ceruloplasmina que sequestram ferro e cobre inibindo a formação de radicais livres (49).

A segunda linha de defesa é formada por antioxidantes que suprimem a iniciação da cadeia ou quebrem as reações de propagação da cadeia (antioxidantes eliminadores de radicais). Essa capacidade de eliminação é exercida pela doação de eletrões. Os radicais recém-resultantes podem ser facilmente neutralizados, tornando-se espécies não prejudiciais. Esta categoria inclui antioxidantes hidrofílicos (ácido ascórbico, glutatona, ácido úrico), bem como lipofílicos (α -tocoferol e ubiquinol) (49).

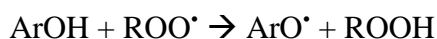
A terceira linha de defesa compreende os antioxidantes reparadores que atuam após a ocorrência de danos dos radicais livres. Este grupo é formado por enzimas que reparam ADN, lípidos e proteínas danificados. Estes antioxidantes são capazes de reconhecer, decompor e remover proteínas, lípidos e ADN oxidados/danificados, contornando a sua acumulação celular. Os exemplos mais frequentemente encontrados deste tipo são enzimas de reparação de ADN (polimerases, glicosilases e nucleases) e enzimas proteolíticas (peptidases, proteases e proteinases) que estão presentes tanto na mitocôndria como no citosol de células de mamíferos (18).

A quarta linha de defesa compreende os antioxidantes que atuam explorando mecanismos de adaptação: utilizam os sinais necessários para a produção de radicais livres, ou para reações envolvendo radicais livres, evitando a geração de radicais livres ou reações envolvendo espécies radicais. No mecanismo de adaptação, o sinal gerado por uma espécie de radical livre induz a síntese e transporte de um antioxidante adequado para o local adequado (18).

3.2 Mecanismos para a determinação da atividade antioxidante

3.2.1 HAT: *Hydrogen Atom Transfer* (Transferência de Átomo de Hidrogénio)

No mecanismo HAT, os antioxidantes realizam a sua atividade eliminadora de radicais livres, predominantemente fornecendo elétrons ou átomos de hidrogénio aos mesmos. Em consonância com esse mecanismo, um antioxidante (ArOH) interage com um radical livre (ROO[•]) diretamente e neutraliza o elétron livre dos radicais livres, doando-lhe hidrogénio (14) e tornando-se num radical (ArO[•]).



Neste mecanismo, a entalpia de dissociação de ligações (EDL) é um parâmetro importante na avaliação da ação antioxidante. Quanto mais baixo o valor de EDL do grupo doador de H no potencial antioxidante, mais fácil será para a reação de inativação dos radicais livres (50).

A EDL refere-se às ligações O – H dos antioxidantes e indica a sua capacidade de fornecer um átomo de hidrogénio a um radical livre. Compostos com alta atividade antioxidante normalmente mostram baixos valores de EDL, indicando uma dissociação O – H mais fácil e implicam uma maior interação com os radicais livres (51).

$$\text{EDL} = \text{H}_{\text{ArO}^{\bullet}} + \text{H}_{\text{H}^{\bullet}} - \text{H}_{\text{ArOH}}$$

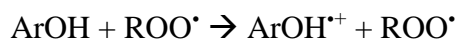
Deve-se ter muito cuidado ao selecionar um antioxidante e deve-se tomar atenção às seguintes medidas preventivas (14):

1. Os radicais livres antioxidantes e antioxidantes devem ser relativamente inativos;
2. A^{*} deve se deteriorar para fornecer produtos seguros;
3. Poder ser renovável ou reciclado;
4. Se o antioxidante quebrar a cadeia ao doar hidrogénio, ele deve estar no topo da hierarquia da cadeia alimentar.

Portanto, para que um determinado composto seja um bom antioxidante, as novas espécies de radicais formadas após a reação de eliminação devem ser mais estáveis e inócuas para as células do que o radical livre inicial (51).

3.2.2 SET: *Single Electron Transfer Mechanism* (Mecanismo de Transferência de Eletrão Único)

Neste caso, o antioxidante (ArOH) pode oferecer um eletrão a um radical livre (ROO^{*}), tornando-se num catião radical (ArOH^{•+}). O valor do potencial de ionização mais baixo facilita a separação do eletrão (51):



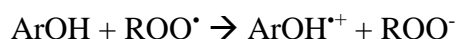
Nesse mecanismo, o “Potencial de ionização” (PI) do antioxidante é o fator energético mais importante na avaliação da ação antioxidante e que pode ser avaliada com o auxílio da

$$\text{seguinte equação (14): PI} = H_{\text{ArOH}^{\bullet+}} - H_{\text{ArOH}}$$

Onde $H_{\text{ArOH}^{\bullet+}}$ e H_{ArOH} são as entalpias do radical catiónico e do composto, respetivamente.

3.2.3 SET-PT: *Single Electron Transfer Accompanied with Proton Transfer* (Transferência de eletrão único acompanhada de transferência de protão)

Uma reação de duas etapas está envolvida neste mecanismo. O radical livre (ROO^{*}) reage com uma molécula antioxidante (ArOH), por exemplo, uma molécula na primeira etapa, onde o antioxidante aparece como uma forma radical catiónica e o outro como uma forma radical aniónica.



$\text{ArOH}^{\bullet+} \rightarrow \text{ArO}^{\bullet} + \text{H}^+$ Essa reação é uma etapa crucial neste processo de duas etapas em termos de termodinâmica. O radical catiónico do antioxidante $\text{ArOH}^{\bullet+}$ divide-se num radical fenólico ArO^{\bullet} e num protão H^+ na segunda etapa (14).

Os “Potenciais de ionização adiabáticos” (PIA) e as “Entalpias de dissociação de prótons O – H” (EDP) fornecem informações sobre a energia da primeira etapa e da segunda etapa, respetivamente. Valores baixos de IP indicam uma tendência maior em formar um anião radical superóxido, aumentando a atividade antioxidante (51).

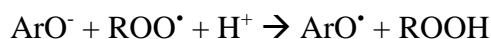
A equação para o cálculo de EDP, pode ser dado como:

$$\text{EDP} = H_{\text{LO}^\bullet} + H_{\text{H}^+} - H_{\text{LOH}^{\bullet+}}$$

em que H_{LO^\bullet} , H_{H^+} e $H_{\text{LOH}^{\bullet+}}$ são as entalpias do radical, do próton e do radical catiónico.

3.2.4 SPLET: *Sequential Proton Loss Electron Transfer* (Transferência de eletrão e perda sequencial de próton)

Neste mecanismo também está presente uma reação de duas etapas. Na primeira etapa, ocorre a desprotonação do antioxidante (ArOH), transforma-se numa forma aniónica (ArO⁻) e num próton (H⁺). O radical livre (ROO[•]) irá reagir com os iões formados na primeira reação. Como resultado, um radical antioxidante fenólico (ArO[•]) e uma molécula neutra (ROOH) aparecem na segunda reação (14).

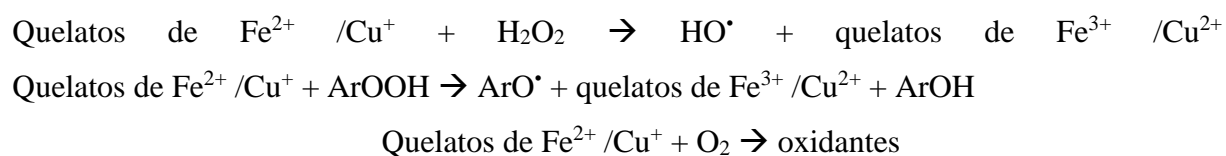


Neste mecanismo, o que ocorre na primeira etapa é a desprotonação do composto fenólico, assim a “Afinidade de próton” (AP) do anião (ArO⁻) é adequada para avaliar a viabilidade desta etapa. Na etapa seguinte, ocorre transferência de eletrões pelo que a variável numérica para avaliar esta etapa é a “Entalpia de transferência de eletrões” (ETE). Estas variáveis podem ser calculadas através das equações: $\text{AP} = H_{\text{ArO}^-} + H_{\text{H}^+} - H_{\text{ArOH}}$ onde H_{LO^\bullet} , H_{H^+} e H_{LOH} são as entalpias do anião, próton e do composto, respetivamente. $\text{ETE} = H_{\text{ArO}^\bullet} - H_{\text{ArO}^-}$ aqui H_{LO^\bullet} e H_{LO^-} são as entalpias do radical e do anião, respetivamente.

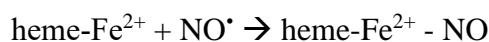
3.2.5 TMC: *Transition Metals Chelation* (Quelação de metais de transição)

Ferritina, lactoferrina, albumina e ceruloplasmina são algumas proteínas de ligação a metais que se ligam a iões de ferro e cobre livres e que têm capacidade de catalisar reações oxidativas. O ferro e cobre são os principais metais que são direcionados principalmente para a produção de radicais livres, porque normalmente se ligam fracamente a proteínas. Transferrina,

hemoglobina e ceruloplasmina são os exemplos de algumas biomoléculas nas quais existe ligação proteína-metal. Existem muitos agentes quelantes que podem formar quelatos fortes com íons metálicos. Por exemplo, Fe^{3+} forma quelatos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e ácido dietilenotriamina pentacético (DTPA) e Fe^{2+} com fenantrolinas, ácidos salicílicos, etc. Ferro em heme, bem como ferro fracamente ligado a proteínas e ADN, pode ser tóxico. As reações de ferro e oxigénio são uma via importante para a iniciação da cadeia de formações de radicais livres em oxidações biológicas, porque promovem a produção de oxidante perigoso conforme as seguintes reações (14):



Medidas preventivas podem ser tomadas com o radical NO^\bullet , no caso do quelato Fe^{2+} . Ele forma um composto coordenado com o ferro-heme:



Qualquer molécula orgânica dissociável pode formar quelato com metais. Os aniões polifenóis, em particular, têm uma forte tendência para formar complexos quelatos com metais. Uma vez que hidroxilos desprotonadas em polifenóis estão frequentemente envolvidas na quelação de metal (14).

A distribuição de eletrões em *highest occupied molecular orbital* (HOMO) e *lowest unoccupied molecular orbital* (LUMO), bem como a densidade de spin das moléculas, são outros descritores significativos das propriedades antioxidantes. A capacidade de uma molécula de doar um protão é prejudicada devido à sua menor capacidade de HOMO. Isso significa que a distribuição HOMO identifica os grupos químicos numa molécula que são vulneráveis ao ataque de radicais livres. A densidade de spin de uma molécula descreve a distribuição de eletrões não emparelhados e a estabilidade da conformação radical de uma molécula. É possível deduzir o grau de atividade química de uma molécula a partir da diferença nos níveis de energia LUMO e HOMO. A seguinte fórmula foi usada para calcular a diferença de energia ΔE entre os níveis de energia LUMO e HOMO:

$$\Delta E = E_{\text{LUMO}} - E_{\text{HOMO}}$$

ΔE (LUMO - HOMO) é inversamente proporcional à atividade da molécula. Um valor baixo é indicativo de uma menor reatividade da molécula (14).

3.3 Métodos para a determinação da atividade antioxidante

Existem vários métodos para a determinação da atividade antioxidante baseados nos mecanismos anteriormente revistos.

Ensaio baseado em SET incluem eliminação de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), eliminação de ácido 2,2'-azino-bis 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico (ABTS), ensaios muito conhecidos pelas abreviaturas CUPRAC (do inglês *CUPric reducing antioxidant capacity*), TEAC (do inglês *trolox equivalent antioxidant capacity*), FRAP (do inglês *ferric reducing antioxidant power*) e conteúdo fenólico total com reagente Folin Ciocalteu (FC, do inglês *phenol content*), entre outros menos usados. Os exemplos para os métodos baseados em HAT são os ensaios conhecidos pelas abreviaturas ORAC (do inglês *oxygen Radical Absorbance Capacity*) e TRAP (do inglês *total reactive antioxidant potential*) entre outros mas menos usados (52)(53)(54).

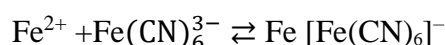
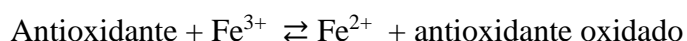
Os testes baseados em SET medem a capacidade dos antioxidantes na redução de um oxidante (radical livre sintético) com uma determinada cor e que após a reação apresenta outra cor ou perde mesmo a cor, alterações que podem ser medidas, por exemplo, por espectrofotometria UV-visível (53). Alguns testes baseados em HAT medem a variação de fluorescência do sistema, por exemplo, na reação em que um antioxidante consegue remover os radicais livres doando um átomo de hidrogénio origina uma perda de fluorescência (55).

O ensaio DPPH[•] é um dos métodos mais populares e frequentemente utilizado entre os ensaios antioxidantes por ser rápido, simples e barato (53). Os compostos antioxidantes presentes no meio convertem o radical DPPH[•] num produto reduzido DPPH[•] mais estável através da doação de um eletrão ou de um átomo de hidrogénio. Ocorre uma mudança de cor, a cor roxa do radical DPPH[•] passa a amarelo-pálido na forma reduzida de DPPH[•], o que permite a determinação espectrofotométrica da atividade antioxidante. O radical livre DPPH ao reagir com um doador de hidrogénio leva a uma diminuição na absorvância e a atividade antioxidante é então medida monitorizando a sua descoloração (52).

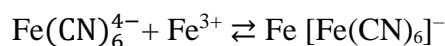
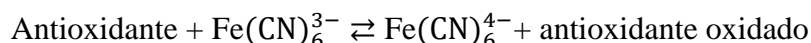
O monocatão radical pré-formado do ácido 2,2'-azino-bis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic (ABTS^{•+}) é gerado pela oxidação de ABTS com persulfato de potássio e tem cor verde. ABTS^{•+} ao ser reduzido na presença de antioxidantes doadores de hidrogénio (56) gera a produção direta do ABTS que é incolor. Esta variação pode ser avaliada num colorímetro a

um comprimento de onda de 734 nm (53).

O ensaio FRAP é um método típico baseado em ET que mede a redução do complexo ião férrico (Fe^{3+})-ligante para o complexo ferroso de cor azul intensa (Fe^{2+}) por antioxidantes em meio ácido (pH 3,6), para manter a solubilidade do ferro e conduzir a transferência de elétrons (57). O ensaio FRAP original usa o complexo de tripiridiltriazina férrico (Fe^{3+} -TPTZ) que é reduzido a uma forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ) quantificada num máximo de absorção de 593 nm. Esse aumento é proporcional ao poder redutor férrico total da amostra testada (50). Mais recentemente, o ferricianeto de potássio tem sido o reagente férrico usado em ensaios FRAP. Neste último caso, o azul da prússia é produzido como produto final, o qual é quantificado espectrofotometricamente e indica o poder redutor dos antioxidantes testados. A produção do azul da Prússia pode ser feita por duas vias diferentes com o mesmo resultado. Os antioxidantes podem reduzir o Fe^{3+} na solução a Fe^{2+} que se liga ao ferricianeto ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) para produzir o azul da prússia, ou reduzir o ferricianeto a ferrocianeto, que se liga ao Fe^{3+} livre na solução e forma o azul da prússia (57).



Ou



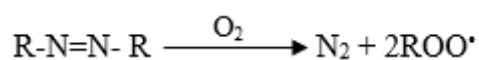
O ensaio CUPRAC é um ensaio de redução de cobre desenvolvido como uma variante do ensaio FRAP. O ensaio mede o poder redutor dos antioxidantes para converter o ião cúprico (Cu^{2+}) em cuproso (Cu^{+}). Semelhante ao ensaio FRAP, um ligante é utilizado para formar um complexo cobre-ligante para facilitar a medição da absorvância. Neocuproína (2,9-dimetil-1,10-fenantrolina) é o ligante comumente utilizado neste ensaio. O complexo Cu^{2+} -neocuproína pode ser reduzido por antioxidantes originando o complexo Cu^{+} -neocuproína que é um cromóforo com absorção máxima a 450 nm (57).

O teste de Folin-Ciocalteu é um método bem conhecido voltado para a determinação do conteúdo fenólico total (CFT). O ensaio de Folin-Ciocalteu é baseado na redução do reagente Folin-Ciocalteu por compostos fenólicos em condições alcalinas. O reagente Folin-Ciocalteu contém complexos do ácido fosfomolibdico/fosfotúngstico que são reduzidos, originando um cromóforo de cor azul com absorção máxima em 765 nm (58). O ião molibdénio central no complexo é aceite como um sítio redutor, onde o ião Mo^{6+} é reduzido a Mo^{5+} ao aceitar um elétron doado pelo antioxidante fenólico (55). Assim, o ensaio Folin-Ciocalteu é um ensaio

baseado em ET e associado ao poder redutor dos antioxidantes fenólicos. O ácido gálico é o padrão de referência comumente usado e os resultados do TPC são geralmente expressos como equivalentes de ácido gálico (57).

O ensaio TEAC mede a capacidade dos antioxidantes de eliminar o catião radical estável $ABTS^{*+}$, um cromóforo azul-esverdeado com absorção máxima em 734 nm que diminui a sua intensidade na presença de antioxidantes. Os antioxidantes podem neutralizar o catião radical $ABTS^{*+}$ por redução direta via doação de elétrões ou por extinção radical via doação de átomo de hidrogénio, e o equilíbrio desses dois mecanismos é geralmente determinado pela estrutura antioxidante e pH do meio. Portanto, embora o ensaio TEAC seja geralmente classificado como um método baseado em ET, o mecanismo HAT também se aplica. A extensão da descoloração da cor azul-esverdeada, quantificada como uma diminuição na absorbância a 734 nm, depende da duração da reação, da atividade antioxidante intrínseca e da concentração na amostra. Os resultados obtidos pelo ensaio TEAC são relatados como equivalentes trolox.

O método ORAC avalia a atividade de eliminação do radical peroxilo gerado por compostos azo (ex: AAPH, do inglês *2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride*) por parte dos antioxidantes (59)(50). A reação de geração do radical peroxilo é simplificada conforme abaixo:



Neste ensaio, o radical peroxilo emitido por um gerador reage com uma amostra fluorescente, normalmente a β -ficoeritrina ou fluoresceína, oxidando-a e fazendo com que ocorra perda de fluorescência. Este ensaio mede até que ponto a amostra antioxidante protege a β -ficoeritrina da oxidação na presença de AAPH. O efeito protetor da amostra testada é medido a partir da área sob a curva de desaparecimento de fluorescência da amostra teste, em comparação com o branco. A β -ficoeritrina tem uma limitação devido à ligação não específica com polifenóis; portanto, a β -ficoeritrina costuma ser substituída por fluoresceína (50). Um antioxidante padrão, geralmente trolox, é usado como referência, e os valores ORAC dos antioxidantes testados são relatados como equivalentes de trolox (50).

O teste TRAP é baseado na capacidade dos antioxidantes de inibirem a reação entre os radicais peroxilo e uma molécula alvo, que inicialmente representava o consumo de O_2 (como uma amostra) no processo de peroxidação desencadeado pela decomposição térmica de AAPH. O tempo de absorção de O_2 pode ser medido quantitativamente e usado para expressar a capacidade antioxidante total das amostras como o valor TRAP (55). O desaparecimento da fluorescência é também medido tal como no ensaio de ORAC e os resultados expressos como

equivalentes trolox. (50)

Os métodos até agora referidos são apenas alguns exemplos, porque muitos outros existem e que não vão ser sujeitos a revisão no presente trabalho.

4. Radiação Ultravioleta e produção de ERO

Em humanos, a pele é o maior órgão do sistema tegumentar e funciona como uma barreira física contra a perda de água bem como de agressões ambientais, tais como, patogénicos, produtos químicos, agentes físicos e radiação solar UV pois a pele está constantemente exposta durante as atividades normais do quotidiano (60). A radiação UV (RUV) da luz solar é o principal fator ambiental que induz o envelhecimento da pele humana e resulta na acumulação de pigmentos e na formação de rugas, mas também leva a danos e doenças, tais como, queimaduras solares e cancro. A pele humana é frequentemente afetada pelo stresse oxidativo causado pela exposição contínua à radiação solar UV (61). O stresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e metabolitos reativos, comumente conhecidos como ERO e a sua eliminação por mecanismos protetores, denominados antioxidantes. Quando a homeostase entre antioxidantes e espécies reativas é perturbada, a superprodução de ERO torna-se tóxica, reagindo incontrolavelmente com macromoléculas endógenas incluindo lipídios, proteínas e ADN, causando sérios danos às células e tecidos (62).

A pele exposta a RUV e poluentes oxidantes ambientais está associada a diversas reações anormais, incluindo respostas inflamatórias, hiperplasia epidérmica, degradação do colagénio e acumulação de melanina (61). Em termos de efeitos clínicos em humanos, é possível afirmar que a RUV provoca eritema, pigmentação, imunossupressão, fotoenvelhecimento ou carcinogénese (63). A RUV pode ser classificada em três subtipos: A, B e C com base no seu comprimento de onda (61), variando a radiação UVB entre os 280 e 320 nm e que induz mais stresse celular aos humanos comparativamente aos outros dois subtipos (61)(64). A RUVB provoca doenças cutâneas e danos pois induz a superprodução de ERO, inibe a síntese de colagénio e degrada o colagénio ao estimular a atividade da collagenase nos fibroblastos dérmicos, o que, conseqüentemente, causa a formação de rugas (64). A radiação UVA varia entre os 320 e 400 nm, penetra a pele até a derme, levando também à produção de ERO que estão envolvidas no processo de fotoenvelhecimento (65)

5. Envelhecimento

Existem, por definição, dois tipos de envelhecimento: envelhecimento intrínseco e envelhecimento extrínseco. O envelhecimento intrínseco é um processo natural e gradual de degradação da pele com a idade e ocorre quando as células têm uma produção mais baixa de colagénio, níveis mais baixos de elastina e uma eliminação mais lenta das células mortas da pele e substituição por novas células. A causa do envelhecimento intrínseco é atribuída à formação contínua de ERO. Em contraste, o envelhecimento extrínseco é causado por fatores externos, como gravidade, tabagismo, má nutrição e exposição excessiva à RUV. Esses fatores externos aceleram o envelhecimento da pele, fazendo com que ela desenvolva pigmentação irregular, palidez, rugas profundas e ressecamento (66).

O colagénio é a principal proteína estrutural da matriz extracelular (ME) da pele e contribui para a estabilidade e integridade estrutural dos tecidos, conferindo tensão, elasticidade e flexibilidade à pele. A principal causa das rugas é a perda de proteína estrutural (colagénio tipo 1) na camada dérmica da pele através das enzimas metaloproteinases de matriz (MMPs), colagenase e elastase que são as responsáveis pela degradação de vários componentes da MEC, ou seja, colagénio e elastina. Desta forma, quantidade de colagénio diminui e conseqüentemente a espessura da pele também, fazendo com que surja a formação de rugas (60,61).

As MMPs são responsáveis por mudanças na estrutura e função do tecido da pele que ocorrem durante o envelhecimento. Das várias MMPs humanas, MMP-2 e -9 (gelatinase A e B) são secretadas como zimogénios solúveis inativos e degradam vários substratos da ME como gelatina, colagénio e fibronectina (66).

Em relação aos níveis excessivos de ERO, estas irão subsequentemente ativar as vias de sinalização celular, incluindo o *nuclear factor kappa B* (NF- κ B), proteína ativadora 1 (PA-1) e *mitogen activated protein kinases* (MAPKs) que estimulam a expressão de MMPs (67). As MMPs são uma classe de enzimas estruturalmente semelhantes e desempenham um papel importante na remodelação fisiológica e patológica de tecido. As MMPs degradam o colagénio da ME nos tecidos conjuntivos, que é o principal fator de enrugamento (61).

6. Cosmética

6.1 História

A história da atividade cosmética teve início muito antes de o ser humano se organizar em sociedades, isto é, se se consider a decoração corporal como uma atividade da cosmética.

Um exemplo, é o homem de Neandertal que, em 100.000 a.C., já utilizava tintas corporais para aplicação de padrões decorativos no corpo para caçar (68)(69).

Seguindo uma linha temporal, os Egípcios foram os primeiros a usar “cosméticos”, através da aplicação de uma tinta nos olhos, de seu nome *Kohl*, como forma de embelezar e proteger os seus olhos dos raios solares (70) e também pela aplicação de óleos, loções e pomadas como forma de limpeza. Foram os Gregos que deram origem à palavra “cosmética”, pois deriva do grego *Kosmétique* que significa “arte de enfeitar (-se), de embelezar (-se)”(69) (71).

Os Gregos que aplicavam chumbo tóxico branco nos seus rostos para obterem uma aparência pálida, pintavam os lábios com uma pasta de óxido de ferro ou ocre misturado com azeite e utilizavam, tal como os Egípcios, *kohl* para colocar como sombra nos olhos e ligar as sobrancelhas. Posteriormente, os romanos foram considerados um exemplo de elegância devido à sua utilização de cosméticos para efeitos de higiene e beleza utilizando pó de giz, chumbo branco e creme feito de gordura animal, amido e óxido de estanho para tornar a pele mais pálida. (72). Ainda na antiguidade, na China, as práticas de higiene e roupas indicavam o status na sociedade (73).

Passando para o primeiro milénio d.C., da espécie vegetal hena (*Lawsonia inermis* L.) extrai-se um corante que se tornou popular como tinta para cabelo e para a pintura de desenhos complexos nas mãos por volta de 300-400 d.C. no Norte da África, Península Arábica e Sul da Ásia (72).

Estes são alguns exemplos de como, desde cedo, a cosmética esteve sempre presente no quotidiano das diversas civilizações, a partir do momento em que as mesmas se começaram a preocupar com a aparência e a ter a perceção de que a utilização de cremes, pós e pastas poderiam auxiliar a realçar a beleza, decorar como uma expressão criativa, esconder imperfeições, preservar a beleza e combater os estragos do tempo e da exposição solar (74).

6.2 Definição

Atualmente, a utilização de cosméticos é algo que está intrínseco na sociedade, pois a sua utilização é algo que está muito relacionado com a sociedade e de como esta dita o que é belo, atraente e do senso de moda (73).

A utilização de cosméticos deriva de uma ciência, a Cosmética, que tem sofrido uma evolução ao longo de milhares de anos, pelo que a sua definição é fundamental. Neste sentido, numa pesquisa no motor de busca *Google*, obtém-se um elevadíssimo número de resultados de

definições, nomeadamente 5 510 000 (75). Num dos resultados de pesquisa, de um dicionário (76), a Cosmética é definida como:

cos.mé.ti.ca - nome feminino

1. indústria de fabricação de cosméticos
2. conjunto dos produtos utilizados em estética corporal
3. disciplina que trata da valorização estética do corpo humano

No entanto, não basta uma pesquisa simplista, é essencial ter em consideração a legislação, pela sua clareza e objetividade sobre este tema.

A cosmética, do ponto de vista regulamentar, está inserida na legislação dos Produtos Cosméticos e de Higiene Corporal, pelo que não existe uma definição do conceito de cosmética, mas sim, do resultado da sua atividade: os produtos cosméticos.

Atente-se ao Regulamento da Comissão Europeia (CE) Nº 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de novembro de 2009 relativo aos produtos cosméticos e também ao Decreto-Lei n.º 189/2008, de 24 de setembro. Ambos no artigo 2.º e alínea p) do referido Decreto-Lei, mencionam que:

“Produto cosmético” é qualquer substância ou mistura destinada a ser posta em contacto com as partes externas do corpo humano (epiderme, sistemas piloso e capilar, unhas, lábios e órgãos genitais externos) ou com os dentes e as mucosas bucais, tendo em vista, exclusiva ou principalmente, limpá-los, perfumá-los, modificar-lhes o aspeto, protegê-los, mantê-los em bom estado ou corrigir os odores corporais (77)(78).

Entende-se, pois, que os cosméticos abrangem um espectro muito amplo de produtos em várias categorias, englobando os produtos de higiene corporal, como sabonetes, geles de banho, champôs, desodorizantes, pastas dentífricas, e os produtos de beleza, como tintas capilares, vernizes e maquilhagem (79).

7. Cosmecêuticos

Em 1962 surge o termo cosmecêutico, introduzido por Raymond E. Reed, membro fundador da *Society of Cosmetic Chemists*. que definia cosmecêutico através de 4 critérios (80):

1. Um cosmecêutico é um produto cientificamente projetado para aplicação externa ao corpo humano.
2. Um cosmecêutico produz um resultado útil e desejado.
3. Um cosmecêutico tem propriedades estéticas desejáveis.

4. Um cosmecêutico atende a rígidos padrões químicos, físicos e médicos.

Contudo, foi na década de oitenta, através do Dr. Albert Kligman, com o desenvolvimento da tretinoína sob prescrição médica para melhorar a aparência da pele enrugada e danificada pela radiação ultravioleta, que a palavra e o conceito foram popularizados com um novo significado (81). Para Kligman, “um cosmecêutico é algo entre um fármaco e um cosmético. Um cosmecêutico faz algo mais do que colorir a pele e algo menos do que um fármaco” (82).

Um cosmecêutico significa um híbrido entre produtos farmacêuticos e produtos cosméticos de aplicação externa destinados a realçar a beleza através de ingredientes ativos que fornecem funções ou benefícios adicionais à saúde, pois são capazes de modificar a estrutura e função biológica da pele (83)(84). Depreende-se, então, que os cosmecêuticos se encontram numa zona fronteira visto que representam uma interseção entre a indústria farmacêutica e a indústria cosmética.

Em suma, a indústria cosmética, utiliza este conceito para fazer referência a produtos que afetam a saúde da pele ou que têm um efeito sustentado na aparência da pele após o momento da aplicação e implicam uma ação fisiológica ou farmacológica (81). Do ponto de vista do consumidor, os cosmecêuticos, são considerados uma categoria de produtos que funcionam como cosméticos ativos que vão além do mero adorno e aroma da pele (85).

Tendo em consideração a definição de cosmecêutico e de este se apresentar numa zona fronteira entre duas áreas distintas, é relevante dar a conhecer igualmente a definição de produto farmacêutico ou como é denominado commumente, medicamento.

Atente-se ao Artigo 1º da Diretiva (CE) n.º 2001/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de novembro de 2001 e ao Decreto-Lei n.º 176/2006 de 30 de Agosto, no artigo 3.º, alínea ee), um medicamento é considerado como “toda a substância ou composição apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas relativas a doenças humanas” e, adicionalmente, é igualmente considerado medicamento “A substância ou composição que possa ser administrada ao Homem, com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou a restaurar, corrigir ou modificar as funções fisiológicas no homem, é igualmente considerada como medicamento.”(86)(87). Um produto farmacêutico será assim considerado um medicamento, quer pela sua “apresentação”, quer pela sua “função”(88).

Após a exposição das definições de cada um dos três conceitos que foram mencionados desde o início da presente dissertação (produtos cosméticos, cosmecêuticos e medicamentos), é possível evidenciar que os cosmecêuticos poderiam pertencer à categoria de medicamento, uma vez que contêm ingredientes ativos que possuem a função de modificar a estrutura da pele,

contudo, estes não possuem a finalidade de curar ou prevenir uma patologia nem servir de meio de diagnóstico. A definição de produto cosmético também põe em dúvida se, de facto, um cosmecêutico pertence a esta categoria, uma vez que este produto apresenta uma ação além das camadas superiores da pele pois é capaz de influenciar a textura e função biológica pele (84).

É necessário e fundamental esclarecer de que forma os produtos cosméticos, cosmecêuticos e medicamentos são regulamentados e de que forma são introduzidos no mercado. Os estados-membros (EM) da União Europeia (UE), como é o caso de Portugal, em relação aos produtos cosméticos, regem-se pela regulamentação em vigor, nomeadamente pelo Regulamento da Comissão Europeia (CE) N° 1223/2009 do Parlamento Europeu e do Conselho de 30 de novembro de 2009 que tem como finalidade reforçar determinados elementos do quadro regulamentar aplicável aos cosméticos, tais como o controlo no mercado, tendo em vista assegurar um elevado nível de proteção da saúde humana (15).

Relativamente aos medicamentos, os EM regem-se pela Diretiva 2001/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Novembro de 2001 (86) que estabelece um código comunitário relativo aos medicamentos para uso humano. Contudo, para que sejam introduzidos no mercado necessitam de seguir procedimentos comunitários de autorização e fiscalização de medicamentos de uso humano e veterinário que estão presentes no Regulamento (CEE) N° 2309/93 do Conselho de 22 de julho de 1993. Este regulamento remete também para a criação de uma Agência Europeia de Avaliação dos Medicamentos.

Atualmente, a Agência Europeia de Medicamentos (EMA) tem como missão garantir a avaliação científica, a supervisão e o controlo da segurança dos medicamentos para uso humano e animal e tem como principais responsabilidades autorizar e controlar medicamentos na UE (89).

Em Portugal, a entidade responsável por regular e supervisionar o mercado dos produtos cosméticos é Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I.P (Infarmed). A sua missão é, segundo elevados padrões de proteção da saúde pública, garantir o acesso dos profissionais de saúde, dos utilizadores profissionais e dos consumidores a produtos cosméticos de qualidade e seguros.

Os cosméticos não são objeto de uma autorização administrativa prévia à colocação no mercado, ou seja, não são controlados antes de entrarem no mercado, pelo que, para cada produto cosmético colocado no mercado, a pessoa responsável garante o cumprimento das obrigações previstas no Regulamento (CE) n.º 1223/2009, já referido anteriormente.

Após o início da sua comercialização, e de modo a garantir que não representam risco para a saúde do consumidor, estes produtos são controlados pela Autoridade Nacional

Infarmed, sem prejuízo das atribuições e competências legalmente adstritas a outras entidades, designadamente, à Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) (90).

Os cosméticos disponibilizados no mercado devem ser seguros para a saúde humana quando utilizados em condições normais. Antes de um cosmético ser introduzido no mercado, este deve ser submetido a uma avaliação de segurança para a saúde humana, tendo em consideração o perfil toxicológico geral dos ingredientes e do produto final (90).

A Autoridade Nacional Infarmed é igualmente a entidade responsável pela Autorização de Introdução no Mercado nacional dos medicamentos de uso humano, pois estes estão sujeitos a padrões de qualidade, segurança e eficácia, alicerçados na atuação conjunta dos responsáveis pela sua colocação no mercado, das autoridades competentes nacionais e comunitárias. Os diferentes intervenientes (fabricantes, distribuidores, prescritores, farmácias, outros locais de venda e utilizadores) estão sujeitos a um conjunto de obrigações e procedimentos competindo ao Infarmed acompanhar e garantir a sua aplicação (79).

Relativamente ao termo “Cosmecêutico”, a nível nacional, a legislação aplicável ao setor dos produtos cosméticos, nomeadamente o Regulamento (CE) n.º 1223/2009, de 30 de novembro, na sua versão consolidada (Regulamento dos cosméticos) e o Decreto-Lei n.º 189/2008, de 24 de setembro, na sua atual redação (Diploma nacional) não contemplam o termo descrito. O mesmo se aplica a nível europeu, pois a Comissão Europeia não prevê a existência de produtos classificados enquanto “Cosmecêuticos”. Contudo, existe a consciência de que determinados produtos possam suscitar dúvida quanto à sua classificação e categorização, pelo que, existem produtos denominados como “produto fronteira” pois a sua classificação apresenta dúvidas, pela composição, local de aplicação, apresentação e modo de ação. Os produtos fronteira devem ser avaliados caso a caso, tendo em conta todas as suas características (91).

Nos Estados Unidos da América (EUA), a entidade responsável por proteger a saúde pública, garantir a segurança, eficácia e segurança de medicamentos humanos e veterinários, produtos biológicos e dispositivos médicos e garantir a segurança de cosméticos é a *Food and Drug Administration* (FDA).

Relativamente aos cosméticos, apesar de não ser necessário que produtos e ingredientes cosméticos, além de aditivos de cor, possuam a aprovação da FDA antes de serem introduzidos no mercado, existem leis e regulamentos que se aplicam a cosméticos no mercado no comércio interestadual. As duas leis mais importantes pertencentes a cosméticos comercializados nos EUA são a Lei Federal *Food, Drug and Cosmetic* (FD&C) e a Lei *Fair Packaging and Labeling* (FP&L). A FDA regula cosméticos sob a autoridade dessas leis e embora esta não reconheça o termo “Cosmecêutico” pois não apresentam nenhum significado sob a lei porque

são vistos puramente como cosméticos, a indústria cosmética usa esta palavra para se referir a produtos cosméticos que têm benefícios medicinais ou semelhantes aos de fármacos (92)(93).

Contrariamente à EU, nos EUA um produto pode ser um medicamento, um cosmético ou ambos. A Lei FD&C define medicamentos como aqueles produtos que curam, tratam, mitigam ou previnem doenças ou que afetam a estrutura ou função do corpo humano, se um produto fizer tais alegações será regulamentado como um medicamento. Já os cosméticos têm como objetivo embelezar, promover a atratividade, alterar a aparência ou limpar e não se destinam a afetar a estrutura ou função do corpo (93).

Existem países que possuem classes de produtos que se enquadram entre as categorias de cosméticos e de medicamentos: por exemplo, o Japão tem "quase-medicamentos", a Tailândia tem "cosméticos controlados" e Hong Kong tem "Medicamentos de tipo cosmético" (94).

Embora não exista uma classe jurídica denominada "Cosmecêuticos", ao longo dos anos este termo encontrou aplicação e reconhecimento para designar os produtos que se encontram na fronteira entre cosméticos e farmacêuticos (94).

7.1 Cosmecêuticos Marinhos

Os novos paradigmas sociais em relação à juventude e beleza incentivam milhões de consumidores a usar produtos cosméticos no dia a dia. Concomitante, os consumidores têm, cada vez mais, prestado atenção às questões de estilo de vida saudável e do seu impacto na saúde e bem-estar mas também têm vindo a revelar preocupações quanto a questões ambientais e de sustentabilidade, questionando a origem dos produtos, processos de fabricação e implicações ecológicas, juntamente com problemas de segurança de compostos químicos (95)(96). É possível ter a percepção da procura crescente por produtos naturais e ambientalmente sustentáveis através do valor do mercado global para cosméticos naturais que, em 2018, era cerca de 34,5 biliões de dólares e estima-se que alcance aproximadamente 54,5 biliões em 2027 (97).

O mercado global de cosméticos é altamente competitivo e encontra-se em constante evolução pelo que a indústria está altamente comprometida em encontrar fontes naturais de compostos ricos em funções/bioativos, de preferência de matérias-primas sustentáveis e económicas, para fornecer produtos e soluções inovadores que atendam às expectativas dos consumidores. Desta forma, apesar de compostos derivados de plantas ainda serem muito populares e amplamente usados como cosmecêuticos, estes apresentam algumas limitações, tais

como o crescimento lento das plantas e da sua composição química variar de estação para estação e de região para região. Assim, a indústria cosmética tem vindo a expressar interesse relativamente a substâncias bioativas derivadas de outros recursos naturais, nomeadamente de origem marinha, devido ao facto da flora e a fauna marinhas serem fontes ricas em compostos biologicamente ativos com um grande potencial cosmético e também por serem cultivadas rapidamente em grandes quantidades e de forma económica (98) (99) e, de ao mesmo tempo, atenderem às solicitações dos consumidores por produtos "naturais" e "mais saudáveis" (95).

Mais de 70% da superfície da Terra é coberta por oceanos e nas últimas décadas, a exploração dos mesmos permitiu a descoberta de uma diversidade de habitats até então desconhecidos, caracterizados por condições extremas (100). O ambiente marinho é extremamente exigente, competitivo, agressivo e hospeda uma variedade de organismos que são forçados a desenvolver um amplo espectro de formas, funções e estratégias que desempenham um papel crucial para a sua sobrevivência e adaptação nesse meio (101). Um dos exemplos destes mecanismos de autodefesa é o desenvolvimento de uma resposta metabólica eficiente, por exemplo, a produção de metabolitos secundários que lhes permitem preservar a sua sobrevivência e protegerem-se contra ameaças externas (101)(95).

Tal como mencionado anteriormente, através dos diversos organismos marinhos é possível serem extraídos compostos ativos tais como vitaminas, minerais, aminoácidos, proteínas, lípidos, polissacáridos, terpenóides, polifenóis, pigmentos e enzimas que apresentam diversas aplicações e têm sido utilizados em formulações cosméticas (102) (Figura 7.1). As macroalgas devido aos seus compostos ativos apresentam efeitos biológicos na pele tais como antienvelhecimento, antioxidante, hidratante, potenciador de colagénio, fotoprotetor, despigmentante, inibidor da melanina, anti-inflamatório, anticelulite, adelgaçante e atividades antivirais e antibacterianas (95)(64). As biomoléculas produzidas por bactérias marinhas, fungos e protistas semelhantes a fungos exibem assim fotoproteção, atividades antioxidantes e de antienvelhecimento, mas também antimicrobianas e hidratantes (103). As microalgas subaéreas e extremófilas são de interesse para a indústria cosmética principalmente devido à presença de antioxidantes e outros compostos ativos que evitam o envelhecimento prematuro do cabelo e da pele, desidratação e hiperpigmentação causada por RUV ou poluição do ar (104).

O pó de coral é utilizado em aplicação tópica para fornecer minerais à pele, proteção contra a radiação ultravioleta e também como antioxidante, antienvelhecimento, antiacne, bem como na preparação de batons e desodorizantes. No entanto, alguns metabolitos secundários de coral possuem também uma variedade de atividades biológicas que variam desde anti-inflamatório e analgésico, antibacteriano e cicatrização de feridas (105). As esponjas marinhas

flutuações de temperatura, mudanças na salinidade, hidrodinâmica ou períodos de dessecação. Já as cianobactérias estão distribuídas em diversos habitats e adaptadas a condições extremas como desertos, cavernas iluminadas, lagos salgados ou regiões polares (63).

Devido à sua diversidade de constituintes, as algas marinhas têm sido amplamente utilizadas em muitas partes do mundo como fonte de compostos essenciais para a nutrição humana e para as indústrias cosmética e farmacêutica (109). As algas marinhas são ricas em compostos fenólicos, pigmentos, minerais, ácidos gordos, aminoácidos e polissacáridos (64). As macroalgas produzem tanto metabolitos primários, que estão diretamente envolvidos nas funções fisiológicas, em condições normais de crescimento, ou seja, reprodução, como também metabolitos secundários que são produzidos em diferentes condições de stresse, como exposição à RUV, mudanças de temperatura, salinidade ou poluentes ambientais. Os metabolitos primários de algas incluem proteínas, aminoácidos, polissacáridos e ácidos gordos, já os metabolitos secundários produzidos nos tecidos das algas são compostos fenólicos, pigmentos, esteróis, vitaminas e outros compostos bioativos (109).

7.1.2 Microrganismos marinhos

Os microrganismos, incluindo microalgas, fungos, protistas semelhantes a fungos (como traustocitrídeos) e bactérias, têm captado a atenção das indústrias como potenciais produtores de compostos líderes (103) e representam uma grande vantagem como recursos sustentáveis pois muitos microrganismos marinhos são cultiváveis em fermentadores (99).

As bactérias marinhas são abundantes na superfície do mar, mas com o aumento da profundidade a sua predominância vai diminuindo. Elas são produtoras prolíficas de metabolitos secundários para defesa contra outros microrganismos pelo que também podem servir como uma boa fonte de compostos bioativos (105).

Relativamente às microalgas, estas apresentam uma enorme diversidade pelo que se tornam uma rica fonte de compostos bioativos com aplicações potenciais como cosmecêuticos. Algumas delas sintetizam substâncias que absorvem a radiação ultravioleta e podem prevenir a deterioração da matriz extracelular dérmica, rugas, flacidez, aspereza e pigmentação da pele (105).

Os fungos marinhos estão associados a algas, corais e detritos de macrófitas marinhas e podem ser divididos em dois grupos com base na sua capacidade de crescimento em condições marinhas, sendo estes fungos marinhos obrigatórios e facultativos. Os fungos marinhos obrigatórios crescem rapidamente e esporulam exclusivamente num habitat marinho ou

estuarino, enquanto os fungos marinhos facultativos desenvolveram-se em ambientes terrestres e adaptaram-se ao ambiente marinho. Por vezes, é difícil diferenciar a natureza obrigatória ou facultativa dos fungos e, portanto, é utilizada uma expressão mais geral, “fungos derivados do mar”. As condições físicas e químicas extremas no ambiente marinho contribuem para a produção de diversos compostos químicos e alguns fungos marinhos desenvolveram vias metabólicas específicas que não são observadas em fungos terrestres. Alguns fungos marinhos forneceram novos compostos que apresentam uma ampla gama de atividades farmacológicas, variando entre atividade antimicrobiana e anticancerígena (99).

7.1.3 Invertebrados marinhos

Os invertebrados marinhos produzem metabolitos secundários, contudo é essencial ter em consideração a sua relação com microrganismos associados e fitoplâncton, uma vez que alguns dos seus metabolitos secundários isolados são sugeridos como sendo produzidos por grupos funcionais de enzimas originadas de microrganismos associados. Como exemplo, tanto as esponjas marinhas como os corais hospedam uma ampla comunidade simbiótica juntamente com uma enorme produção de metabolitos secundários (105), pelo que têm atraído uma considerável atenção e provado ser uma fonte de novos compostos com atividades biológicas interessantes (110). A biota associada à esponja pode reunir um amplo grupo de linhagens filogenéticas, incluindo arqueas (archaea), bactérias e fungos. As relações entre as esponjas e os seus simbiontes mutualísticos são complexas e a produção de metabolitos secundários bioativos pode ter um possível papel de defesa ou estar envolvida na competição por espaço dentro de habitats bentónicos (102).

As esponjas marinhas são animais exclusivamente aquáticos pertencentes ao filo Porifera, reino Animalia, que dominam muitos habitats bentónicos. São sésseis e não têm tecidos ou órgãos sensoriais, mas têm diferentes tipos de células que conduzem a todas as formas de funções corporais (111).

Os pepinos do mar, equinodermos moles e de corpo cilíndrico, alimentam-se de algas microscópicas absorvendo nutrientes da matéria orgânica. Pertencem à classe Holothuroidea e são outro exemplo de invertebrados marinhos, ricos em compostos bioativos, incluindo saponina, sulfato de condroitina, colágeno, aminoácidos e fenóis (106).

7.2 Papel dos antioxidantes nos cosmeceúticos marinhos

O envelhecimento mediado por UV (fotoenvelhecimento) representa o dano crónico da pele após a exposição solar e é considerado o tipo mais relevante de envelhecimento extrínseco da

pele (112). O termo “antioxidante” abrange uma ampla gama de moléculas com diversas atividades, incluindo fotoproteção e eliminação de ERO, evitando danos oxidativos nos componentes celulares. Conforme o corpo envelhece, a sua capacidade de regular as ERO diminui, enquanto a produção de ERO mitocondriais aumenta, o que significa que os tecidos são mais suscetíveis ao stresse oxidativo com a idade (113). Desta forma, o desejo por uma aparência jovem estimulou o uso de cosméticos antienvelhecimento para a prevenção ou reversão dos sinais de envelhecimento e a evidência direta da geração de espécies reativas na pele mediada pela radiação UV justifica o uso de antioxidantes em formulações tópicas, incluindo cosméticos antienvelhecimento (112). Além disso, o interesse na utilização de antioxidantes de fontes naturais é consideravelmente aumentado pela preferência do consumidor por produtos naturais e pela preocupação com os efeitos tóxicos potenciais dos antioxidantes sintéticos (114).

7.2.1 Macroalgas e as formulações cosmecêuticas

De entre os inúmeros organismos marinhos, as algas marinhas são consideradas uma das mais ricas fontes de ingredientes biologicamente ativos com poderosas atividades biológicas, razão pela qual têm sido o foco de interesse nos últimos anos em várias aplicações cosméticas. Algas marinhas ou macroalgas marinhas são organismos fotossintéticos macroscópicos multicelulares eucarióticos e têm o potencial de produzir um grande número de compostos valiosos pelo que são utilizados em cosmecêuticos. Além disso, os produtos cosméticos à base de algas são vistos pelos consumidores como promissoras alternativas aos cosméticos sintético, sendo considerados mais saudáveis e ambientalmente sustentáveis. Normalmente contêm compostos que, após purificados, são biologicamente ativos ou os extratos com vários compostos bioativos. Vários ingredientes de algas marinhas que são úteis em cosmecêuticos são conhecidos por serem alternativas eficazes com benefícios significativos. Especialmente na área de cosméticos, muitos cientistas relataram atividades benéficas para a pele, como antienvelhecimento, antirrugas, anticelulite, antioxidante, hidratante, despigmentante e fotoproteção (115).

As macroalgas são naturalmente expostas ao stresse oxidativo e desenvolvem vários sistemas protetores eficientes contra ERO e radicais livres, produzindo compostos que podem atuar em cosméticos contra os efeitos nocivos da RUV (116).

7.2.2 Exemplos de cosmecêuticos comercializados contendo macroalgas com ação antioxidante

1. Em 2015 foi lançado para o mercado o EPHEMER™ pela empresa Seppic. É um cosmético para a pele que atua como antioxidante e anti-envelhecimento. É composto por triglicéridos onde predominam os ácidos caprílico/cáprico e extrato de *Undaria pinnatifida*, uma alga castanha. Protege a pele, após 24 horas, agindo sobre as mitocôndrias, causando redução momentânea dos radicais livres (117).
2. Helioguard™ 365 da Mibelle Biochemistry é um agente protetor e antioxidante constituído por água, lecitina, álcool, lactato de sódio, *Porphira umbilicalis* e fenoxietanol. É baseado num aminoácido semelhante a micosporina (MAAs) da alga *P. umbilicalis* que são encapsulados em lipossomas para aumentar a sua absorção na pele. Protege a pele contra os sinais de envelhecimento prematuro e previne o aparecimento de linhas, rugas e outros sinais de fotoenvelhecimento. Helioguard™ 365 pode aumentar a firmeza e densidade da pele, apesar da exposição ao sol pois oferece proteção contra a peroxidação lipídica após a radiação UV, aumento da suavidade, diminuição da profundidade das rugas e efeito de aumento do FPS em uma formulação de filtro solar (118)(119).
3. Helionori® da Gelyma é outro exemplo de antioxidantes naturais e fotoprotetores que também utiliza extratos de *Porphyra umbilicalis* (115). Esta alga contém aminoácidos MAAs que atuam como filtros solares naturais em alguns organismos marinhos. Segundos os autores, HELIONORI® oferece uma alternativa marinha segura aos filtros UVA sintéticos (120).

8. Composição química das macroalgas

Compostos antioxidantes, como florotaninos, carotenoides, tocoferóis e polissacáridos sulfatados são encontrados numa ampla gama de espécies de algas marinhas.

8.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são metabolitos secundários produzidos por plantas, microrganismos e algas. Existem muitas teorias sobre o porquê de os tecidos das macroalgas produzirem e acumularem compostos fenólicos, e uma das teorias mais amplamente aceites afirma que os compostos fenólicos são produzidos como um mecanismo de defesa para proteção contra fatores bióticos e abióticos. Como tal, as macroalgas precisam produzir mecanismos de defesa de suas vias metabólicas que as protejam contra o ambiente hostil e agentes biológicos (121).

8.1.1 Florotaninos

Os florotaninos pertencem a metabolitos secundários polifenólicos isolados apenas de algas castanhas (Phaeophyceae). Os florotaninos podem ser divididos em dois grupos, os florotaninos solúveis (FS) e florotaninos ligados à membrana (FM), de acordo com sua localização nas células de algas castanhas. Os FS são armazenados em organelos celulares, fisódios (Figura 8.1), que são corpos redondos ou elípticos, altamente móveis, semelhantes a vesículas e fortemente refrativos no citoplasma das células de algas castanhas. Acredita-se que os FM se transformem em componentes das paredes celulares quando os fisódios se fundem com a membrana celular e os florotaninos são secretados na parede celular, complexando-se finalmente com o ácido algínico (122).

As algas marinhas castanhas apresentam maior concentração de polifenólicos do que as algas marinhas verdes e vermelhas, e pensa-se que este facto está relacionado com um maior teor de arsénio devido à atividade quelante dos florotaninos (8). O floroglucinol (1,3,5-trihidroxibenzeno) (Figura 8.2), unidade monomérica dos florotaninos, é biossintetizado pela via acetato-polimalonato e a sua polimerização, através do acoplamento oxidativo C-C e/ou C-O-C, origina mais de 150 florotaninos hidrofílicos (123).

De acordo com o tipo de ligação formada entre as unidades de floroglucinol, os florotaninos podem ser agrupados em três tipos primários: (i) fucóis (apenas com ligações fenil), (ii) floretóis (florotaninos com apenas ligações de ariléter) e (iii) fucofloretóis (com ligações ariléter e fenil) (Figura 8.3). Ao aumentar o número de unidades de floroglucinol, a diversidade estrutural aumenta e torna-se necessário usar outros critérios para classificar os florotaninos. Cada um dos grupos primários pode ser agrupado em florotaninos lineares, se todas as unidades de extensão têm apenas duas conexões interfloroglucinol, ou ramificado, se eles se ligam a três ou mais (123).

Como compostos fenólicos, a propriedade biológica mais característica dos florotaninos é sua atividade antioxidante, que tem sido amplamente explorada e é abrangida por um grande número de estudos na literatura contemplando inúmeros extratos ricos em florotanino ou florotaninos isolados de múltiplas espécies de algas e origens geográficas, obtidos com diferentes procedimentos de extração e avaliados por uma infinidade de ensaios antioxidantes (62).

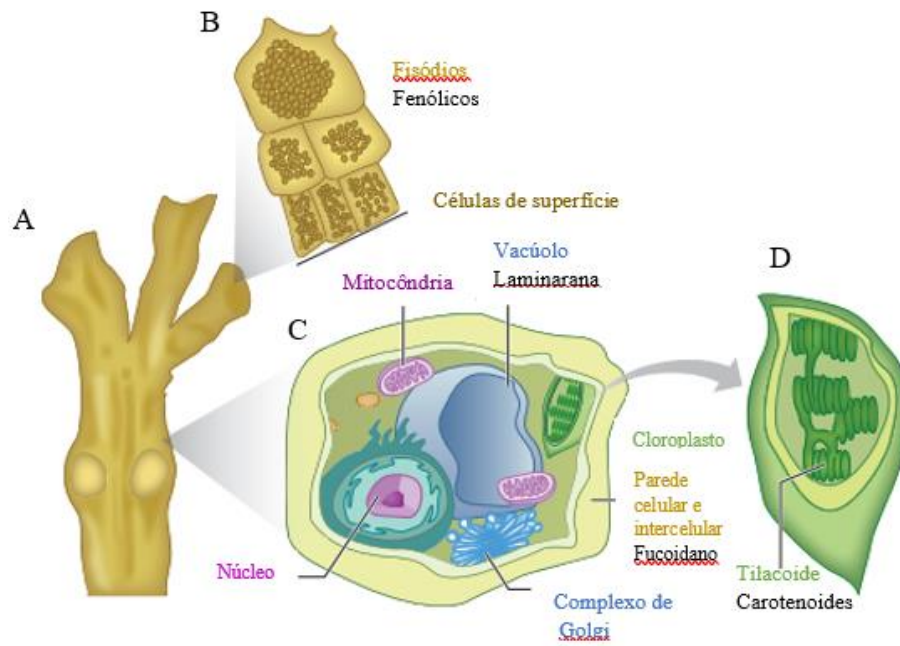


Figura 8.1- Exemplo de uma alga castanha (*Fucus vesiculosus*). (A) Localização dos diferentes compostos antioxidantes: (B) fenólicos e florotaninos, localizados nos fisódios nas células superficiais; (C) laminarana, localizada nos vacúolos da célula das algas marinhas, e fucoidana, embutida na parede celular e nos espaços intercelulares; e (D) carotenóides como o pigmento acessório localizado na membrana dos tilacóides também hospedando a clorofila *a*, que é responsável pela fotossíntese das algas.

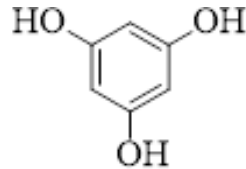


Figura 8.2 – Estrutura química de floroglucinol

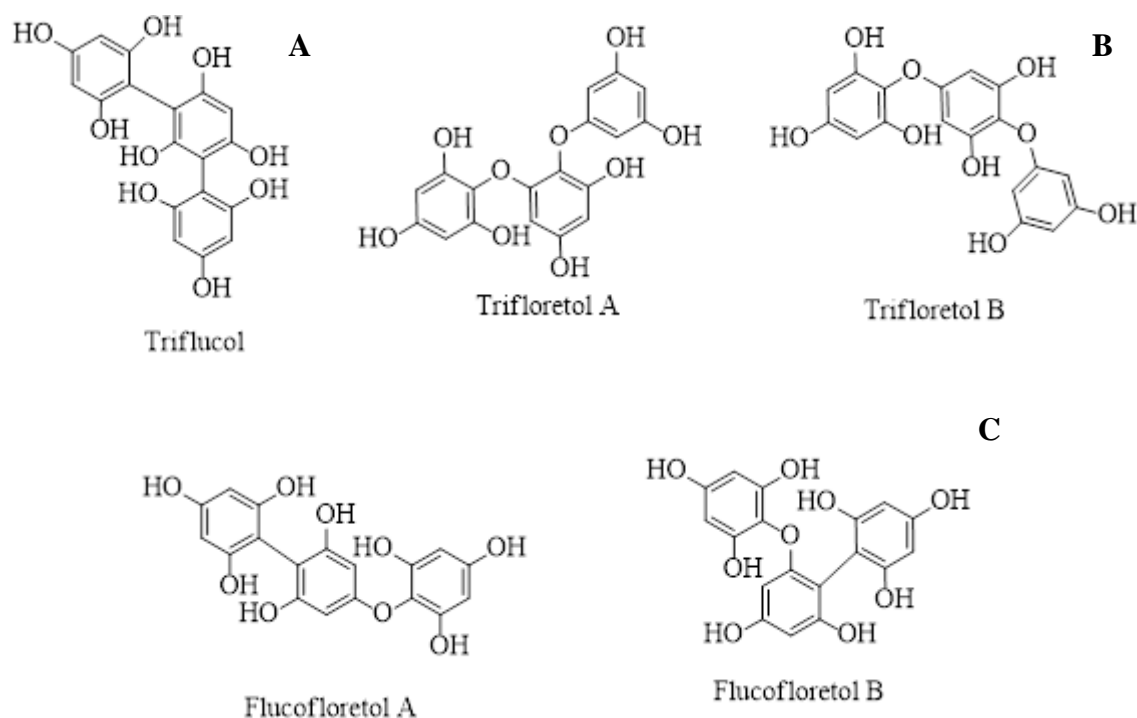


Figura 8.3 – Tipos primários de florotaninos com base em critérios de acoplamento oxidativo (A): Fucóis; (B): Floretois; (C): Fucofloretois

8.2 Polissacáridos

Os polissacáridos, hidratos de carbono ou glúcidos são o maior grupo de todos os metabolitos ativos que ocorrem nas algas (124). São compostos de vários blocos de construção e formam longas moléculas de hidratos de carbono de unidades monossacarídicas ligadas por ligações glicosídicas. São moléculas hidrofílicas e possuem uma estrutura bastante regular. Polissacáridos de algas são componentes estruturais das paredes celulares e atuam como unidades de armazenamento de energia. Existem muitos tipos de polissacáridos biologicamente ativos em tecidos de algas. Geralmente, esses compostos são ingredientes com capacidade hidratante e antioxidante e, portanto, são utilizados em cosmecêuticos. Eles também são amplamente utilizados como agentes gelificantes e estabilizadores em emulsões (109).

Os principais polissacáridos sulfatados encontrados em algas marinhas incluem fucoidano e laminarano de algas castanhas, carragenina de algas vermelhas e ulvana de algas verdes. Os PS possuem excelente atividade antioxidante *in vitro*, incluindo capacidade de eliminação de radicais e capacidade quelante de metal (125).

8.2.1 Fucoidano e laminarina

A laminarina, também conhecida como laminarana, tem atraído cada vez mais a atenção da comunidade de pesquisa como um importante polissacárido biodegradável e não tóxico obtido do armazenamento da parede celular de algas castanhas. A laminarina consiste em β -glucanos ligados por ligações glicosídicas (1,3) e (1,6), em diferentes proporções, dependendo do habitat e da estação de extração. As atividades antioxidantes relatadas são principalmente contra o dano oxidativo causado por ERO e radicais livres (126).

A estrutura do fucoidano varia de espécie para espécie, mas geralmente contém L-fucose e sulfato, junto com pequenas quantidades de D-galactose, D-manose, D-xilose (127). A capacidade antioxidante do fucoidano isolado de várias espécies de algas marinhas foi demonstrada na literatura, pelo que o fucoidano normalmente exibe uma forte atividade antioxidante secundária que é comparável aos antioxidantes sintéticos, como BHA e BHT, que são conhecidos por causar efeitos colaterais em humanos (128).

8.2.2 Carregeninas

As carrageninas podem ser extraídas de Rhodophyta, que são algas vermelhas como *Eucheuma cottonii*, *Chondrus crispus*, *Eucheuma spinosum* e *Gigartina* sp.. A carragenina pode ser dividida em iota (ι), lambda (λ) e kappa (κ) com grupos sulfato em diferentes posições, números e possível presença da ponte 3-6 anidrogactose. A Figura 8.4 mostra as diferentes estruturas químicas da carragenina. A carragenina kappa tem 25% de conteúdo de sulfato e cada duas unidades de açúcar tem um sulfato. Existe um grupo sulfato adicional na posição 2 do resíduo de anidrogactose em iota-carragenina. Os grupos mais sulfatados pertencem a lamda-carragenina entre esses grupos de polissacáridos (129).

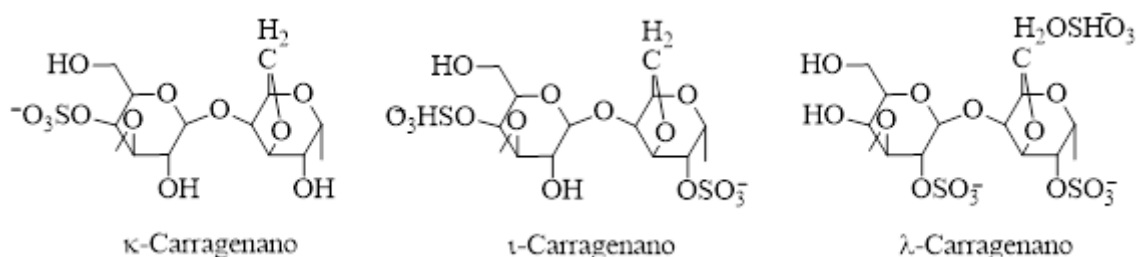


Figura 8.4 – Estrutura química das carrageninas.

8.2.3 Ulvana

Ulvana é um polissacárido da parede celular que contribui com 9 a 36% do peso seco da biomassa de *Ulva* e é composto principalmente de ramnose sulfatada, ácidos urônicos (ácido

glucurónico e ácido idurónico) e xilose (130).

8.3 Aminoácidos semelhantes a micoporina (MAAs)

Os MAAs são polares com baixo peso molecular (> 400 Da) e têm uma estrutura química baseada numa estrutura em anel de ciclohexenona ou ciclohexenimina com substituintes de aminoácidos, pelo que apresentam oxo-MAAs ou imino-MAAs, respetivamente. Os principais oxo-MAAs são micoporina-glicina e micoporina-aurina, enquanto os principais imino-MAAs são shinorine, palitina, asterina-330, porphyra-334, usujirene e palythene (131).

Os MAAs são capazes de absorver comprimento de onda máximo (λ_{\max}) que variam de 310 nm no UVB para estruturas baseadas em ciclohexenona a 360 nm no UVA para estruturas baseadas em ciclohexenimina. Os MAAs fornecem proteção contra a RUV pois têm absorção máxima de UV entre 310 e 360 nm, capacidade de dissipar a radiação absorvida de forma eficiente como calor sem produzir ERO, fotoestabilidade e resistência a diversos fatores abióticos causadores de stress como temperatura, radiação UV, vários solventes e pH (6).

O conteúdo de MAAs em macroalgas varia entre as classes e com o aumento da profundidade e latitudes. Muitas macroalgas produzem um ou vários compostos que absorvem os RUV. A maioria das macroalgas produtoras de MAA pertence a Rhodophyceae, seguida por Phaeophyceae, e apenas algumas algas verdes Chlorophyceae produzem MAAs. Pela sua atividade é expectável que estes compostos possam ter aplicações potenciais em cosméticos como agentes antifotoenvelhecimento/fotoprotetores (6)(132).

8.4 Carotenoides

Os carotenóides são pigmentos multifuncionais, taxonomicamente difundidos e biotecnologicamente importantes. Estes são derivados de oito unidades de isopreno de carbono que são polimerizadas enzimaticamente para formar estruturas regulares de 40 carbonos altamente conjugadas com até 15 ligações duplas conjugadas. Uma ou ambas as extremidades do esqueleto de carbono podem passar por ciclização para formar grupos terminais de anel β -ionona, que adicionalmente podem ser substituídos por grupos oxo, hidroxil ou epóxi em posições diferentes para formar as xantofilas diferentes (6).

Dependendo do comprimento de sua cadeia de ligação dupla conjugada e a natureza dos seus substituintes, os carotenoides na maioria das vezes absorvem luz na faixa de 300-600 nm e aparecem em amarelo, laranja ou vermelho. Os carotenoides são estruturalmente divididos

em duas classes: carotenos, que são exclusivamente hidrocarbonetos, e xantofilas, que são oxigenados. Os carotenoides são moléculas lipofílicas que são capazes de captar luz, onde os carotenoides dissipam o excesso de energia e radicais do oxigénio excitado e atuam como pigmentos acessórios de captação de luz (6). Pelo que desempenham um papel importante na proteção contra processos foto-oxidativos em algas vermelhas, verdes e castanhas. Entre os carotenoides α -e β -caroteno, luteína, violaxantina, neoxantina, zeaxantina e fucoxantina, este último é particularmente interessante devido às suas propriedades promotoras da saúde. A fucoxantina é um oxo-carotenóide (xantofila), que tem pelo menos um átomo de oxigénio e é conhecido como um inibidor eficiente de oxigénio singlete na foto-oxidação. Foi descoberto que, ao induzir a foto-oxidação em emulsões de cuidados com a pele com alto teor de gordura, a presença de carotenoides, como a fucoxantina, inibiu as reações em cadeia de radicais livres causadas pelo processo de foto-oxidação. Os carotenóides também podem atuar como pró-oxidantes sob alta pressão de oxigénio e, assim, promover a oxidação de lipídios. (125)

Os carotenóides também podem ser clivados para formar apocarotenoides, que inclui por exemplo o retinal (vitamina A) (6).

9. Atividade antioxidante de extratos de macroalgas e seus componentes

No sentido de encontrar outras macroalgas que estejam a ser alvo de estudo por possuírem também uma atividade antioxidante para serem integradas em formulações cosmeceúticas, foi realizada uma pesquisa no site *Web of Science™* com o seguinte termo: “MACROALGAE ANTIOXIDANT COSMETIC” entre os anos 2017 e 2021. Foram obtidos cinquenta e oito resultados de pesquisa. Contudo, foram apenas selecionados vinte e cinco artigos, porque alguns artigos faziam referência apenas à atividade antibacteriana, antimicrobiana e anticancerígena das macroalgas; outros referiam somente a variação de compostos ativos ao longo de diferentes estações do ano; outros artigos referiam as novas técnicas de extração de compostos bioativos de macroalgas marinhas, sem mencionar a atividade antioxidante e outro artigo referia a dieta com algas marinhas na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas. As secções seguintes compilam os dados encontrados nesta pesquisa e apresentados por filas a que pertencem as macroalgas.

9.1 Macroalgas castanhas – Filo Phaeophyceae

As algas castanhas constituem a maior classe (com até 2000 espécies) e são

provavelmente as mais investigadas, pois essas espécies contêm um grupo especial de compostos fenólicos biologicamente ativos chamados florotaninos. Os compostos fenólicos presentes nas espécies de algas castanhas são derivados de unidades de floroglucinol polimerizadas através da via do acetato/polimalonato (133).

Na revisão feita por Ariede *et al.* (116) referem-se ao uso recente das algas em formulações cosméticas, mencionando dois compostos antioxidantes quimicamente classificados como florotaninos, o floreoekol e o floroglucinol tetramérico identificados na macroalga castanha *Macrocystis pyrifera* (Figura 9.1). Os autores referem que os florotaninos exibem atividade antioxidante, o que pode contribuir para prevenir o envelhecimento da pele, pois os radicais livres podem ativar a MMP, provocando degradação do colagénio das membranas celulares e dos núcleos celulares dos fibroblastos da pele, mostrando a utilidade de compostos antioxidantes provenientes de macroalgas em produtos anti-envelhecimento (116).



Figura 9.1 – Macrocystis pyrifera. (Retirado de (134)).

No artigo de revisão (134), Lomartire e a sua equipa referem que os florotaninos exercem uma poderosa atividade antioxidante, como é o caso dos florotaninos extraídos de *Sirophysalis trinodis* (anteriormente *Cystoseira trinodis*) o que torna esta espécie uma fonte potencial de compostos fenólicos para diversas aplicações. Os florotaninos extraídos *Eisenia bicyclis* também apresentam atividade antioxidante *in vitro* e é comparado nesta revisão a outros compostos ativos disponíveis, como ácido ascórbico e α -tocoferol. Também mencionam *Sargassum muticum* como uma fonte potencial de compostos fenólicos bioativos e que esta espécie apresenta uma forte atividade antioxidante.

Gager *et al.* (135) realizaram um estudo com o foco no conteúdo fenólico e atividades cosméticas associadas de sete macroalgas castanhas: *Alaria esculenta*, *Ascophyllum nodosum* (Figura 9.2), *Bifurcaria bifurcata*, *Fucus serratus*, *Halidrys siliquosa*, *Himanthalia elongata* e *Laminaria ochroleuca*, selecionadas pela sua abundância na Bretanha e pela sua produção de florotanino. As variações sazonais e anuais dos conteúdos fenólicos foram determinadas para

encontrar a melhor época de colheita para cada espécie, considerando os anos 2015, 2016 e 2017 e as quatro estações. As macroalgas selecionadas pertencem a duas ordens taxonómicas diferentes, Fucales e Laminariales. As algas da ordem Fucales foram escolhidas porque são abundantes em diferentes níveis ao longo da costa da Bretanha e são conhecidas por serem ricas em compostos fenólicos. As algas da ordem Laminariales foram escolhidas porque são facilmente cultivadas em cordas, em sistemas de aquicultura em mar aberto, pelo que a sua produção não depende de populações selvagens (135).

As atividades necessárias para aplicações cosméticas, ou seja, eliminação de radicais, fotoprotetoras e anti-envelhecimento foram avaliadas através de testes *in vitro*. A eliminação de radicais foi avaliada através de dois ensaios colorimétricos DPPH e FRAP e em ambos os testes utilizaram vitamina C e BHA (do inglês *butylated hydroxyanisole*) como controlos positivos.

Neste estudo, as algas da ordem Fucales, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus*, *Halidrys siliquosa* e *Himanthalia elongata* (mas não *Bifurcaria bifurcata*) continham níveis mais altos de compostos fenólicos (> 574 mg/g peso seco (p.s.)) do que as algas da ordem Laminariales *Alaria esculenta* e *Laminaria ochroleuca* (35 a 350 mg/g p.s.). Estes resultados podem ser explicados por *A. nodosum*, *F. serratus* e *H. elongata* viverem no nível da maré média, onde são expostos à RUV, calor e desidratação ou stresse salino, o que aumenta o seu conteúdo fenólico. Contudo, *Halidrys siliquosa* também continha um dos níveis fenólicos mais elevados, apesar de estar quase sempre submerso (135).

A concentração de extrato necessária para causar uma redução de 50% da concentração inicial de DPPH, isto é, a concentração eficiente ou índice de oxidação foi representado por (CE₅₀). Valores mais baixos de CE₅₀ indicam maior atividade antioxidante. As cinco algas da ordem Fucales apresentaram atividades superiores às de Laminariales. Os valores de CE₅₀ (ensaio DPPH) estavam entre 0,010 e 0,353 mg/ mL e os valores de CE₅₀ (teste FRAP) estavam entre 0,001 e 0,004 mg/ mL.

Os autores (135) concluíram que o conteúdo fenólico foi elevado, independentemente da estação do ano, e as atividades antioxidante e fotoprotetora foram semelhantes às das moléculas comerciais, permitindo a colheita de algas durante todo o ano. Estes resultados são promissores para o uso de macroalgas marinhas como fonte de ingredientes ativos naturais para aplicações cosméticas.



Figura 9.2 – *Ascophyllum nodosum* (Retirado de (134)).

Num outro trabalho (136), foi avaliado o efeito de cinco solventes de extração (etanol (Et), acetona (AcT), acetato de etilo (AcEt), clorofórmio (Clf) e hexano (Hex)) no rendimento de extração, conteúdo fenólico e capacidade antioxidante de nove espécies de macroalgas castanhas que podem ser encontradas na costa noroeste da Península Ibérica: *Ascophyllum nodosum*, *Himanthalia elongata*, *Undaria pinnatifida*, *Pelvetia canaliculata*, *Saccharina latissima*, *Bifurcaria bifurcata*, *Laminaria ochroleuca*, *Sargassum muticum* e *Fucus spiralis*.

O conteúdo fenólico total foi avaliado através do método Folin-Ciocalteu e os resultados expressos em equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato seco. As propriedades antioxidantes dos extratos foram avaliadas através de dois métodos: eliminação ou captação dos radicais DPPH e o FRAP. Os resultados do ensaio DPPH foram expressos como equivalente de Trolox (ET) por g do extrato seco, enquanto os resultados de FRAP foram expressos como equivalentes de ácido ascórbico (EAA) por g do extrato seco. O maior rendimento de extração foi alcançado quando o etanol foi usado como solvente, sendo *Undaria pinnatifida* a macroalga que apresentou o valor mais elevado (38,8%). No entanto, em relação aos valores de fenóis, DPPH e FRAP, os solventes AcEt e AcT foram relatados como os mais eficazes, dependendo da alga avaliada, o que sugere uma composição química diferente nas macroalgas castanhas responsáveis pelas atividades antioxidantes. Em relação aos extratos, os maiores valores de fenóis totais foram encontrados para *Ascophyllum nodosum* (211,83 mg de EAG/g de extrato seco) usando AcEt como solvente, mostrando uma possível correlação entre o teor de polifenóis e o poder redutor, enquanto os maiores valores no método do DPPH foram alcançados nos extratos apolares (hexano) de *Bifurcaria bifurcata* (145,61 mg TE/g de extrato seco), sugerindo assim a natureza hidrofóbica do antioxidante produzido por esta espécie (136).

Os resultados do ensaio FRAP variaram de 0,87 (*P. canaliculata* extraído com hexano) a 79,97 mg EAA/g de extrato seco (*A. nodosum* extraído com AcEt). Os valores encontrados quando se utilizou aquele método foram significativamente afetados pelas espécies de algas e

pela natureza do solvente de extração. De uma maneira geral, os extratos de *A. nodosum* promoveram valores mais elevados, que estão de acordo com os resultados de fenóis totais, sugerindo uma relação de causa-efeito entre a concentração de compostos fenólicos e a atividade antioxidante nesta espécie. Este facto pode ser parcialmente explicado considerando que antioxidantes como os polifenóis podem ser agentes redutores mais eficazes para o ferro III, mas não tão eficientes na eliminação dos radicais livres DPPH. Com relação ao solvente, o AcT mostrou-se o solvente mais eficaz para as espécies *U. pinnatifida*, *H. elongata*, *P. canaliculata*, *S. latissima* e *B. bifurcata*, enquanto o AcEt promoveu os maiores valores de FRAP para *L. ochroleuca*, *F. spiralis* e *A. Nodosum*. Os autores (136) concluíram que o conteúdo de compostos bioativos em extratos de algas é altamente dependente do método de extração aplicado. O litoral marroquino possui recursos abundantes de diversas algas marinhas, mas a bioatividade de muitas dessas algas ainda não foi explorada. O objetivo do estudo desenvolvido por alguns autores (137) foi contribuir para a avaliação do potencial antioxidante, utilizando diferentes sistemas *in vitro* de cinco espécies de algas dominantes na costa atlântica marroquina. Quatro delas pertencem ao filo Phaeophyceae: *Bifurcaria bifurcata*, *Cystoseira humilis*, *Cystoseira stricta*, *Fucus spiralis*. Foram determinados os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante para além de outras atividades (atividades anticolinesterásica, anti-tirosinase e anti-urease).

Os resultados foram registados como concentração de inibição de 50% (CI₅₀), ou seja, a concentração da amostra que fornece 50% de efeito de eliminação de DPPH e mostraram que *Fucus spiralis* possuía os maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides em comparação com as demais. A atividade de eliminação do DPPH foi consistentemente maior nos extratos etanólicos de *Fucus spiralis* (CI₅₀: 47,23 ± 3,8 µg/mL). Em contraste, *Bifurcaria bifurcata* (CI₅₀: 208,5 ± 1,4 µg/mL) apresentou a menor atividade de eliminação. Os valores dos compostos de referências foram de CI₅₀: 12,26 ± 0,07 µg/mL para o α-tocoferol, CI₅₀: 54,96 ± 0,99 µg/mL para BHT e de CI₅₀: 2,07 ± 0,11 µg/mL para quercetina (137).

Quanto à eliminação ou captação dos radicais ABTS, também *Fucus spiralis* (CI₅₀: 5,95 ± 0,6 µg/mL) apresentou a maior atividade que foi muito próxima às do α-tocoferol (CI₅₀: 4,87 ± 0,56 µg/mL) e do hidroxitolueno butilado (BHT, do inglês *butylated hydroxytoluene*) (CI₅₀: 4,10 ± 0,06 µg/mL), *Bifurcaria bifurcata* (CI₅₀: 130,6 ± 1,9 µg/mL) apresentou a menor capacidade de eliminação, pelo que, e de acordo com os resultados nos métodos de DPPH e ABTS, *Fucus spiralis* apresentou a melhor capacidade antioxidante.

Na teste de co-oxidação do β-caroteno / ácido linoleico, todos os extratos etanólicos de algas marinhas exibiram atividade antioxidante com valores inferiores a 75 µg/mL e nenhum

deles apresentou melhor atividade do que os padrões antioxidantes (α -tocoferol (CI_{50} : $2,10 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$), BHT (CI_{50} : $1,34 \pm 0,09 \mu\text{g/mL}$) e quercetina (CI_{50} : $1,80 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$)), contudo as atividades de *Fucus spiralis* (CI_{50} : $13,25 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$) e *Cystoseira stricta* (CI_{50} : $13,58 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$) foram semelhantes e exibiram a maior atividade de inibição da peroxidação lipídica entre todos os extratos testados (137). A capacidade quelante de íons ferrosos de extratos de algas marinhas exibiu atividade variável. O extrato etanólico de todas as algas marinhas exibiu melhor capacidade quelante de metais de íons ferrosos do que os padrões de quercetina (CI_{50} : $250,1 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$), sendo a *Bifurcaria bifurcata* a que apresentava melhor capacidade (CI_{50} : $45,22 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$) em comparação com as demais.

Segundo os autores (137), *Fucus spiralis* pode ser uma fonte promissora de antioxidantes a ser usados em cosmeceuticos. No entanto e segundo os mesmos autores, são necessários mais estudos de bioatividade e isolar os constituintes mais promissores. Num estudo, os autores (138) quiseram estudar várias algas, incluindo nove macroalgas castanhas: *Cystoseira osmundacea*, *Dictyopteris delicatula*, *Eisenia arborea*, *Hydroclathratus clathratus*, *Macrocystis pyrifera*, *Neorhodomela larix*, *Padina concrecens*, *Rosenvigea intricata*, *Sargassum horridum* provenientes da Península de Baja Califórnia, no México. Os extratos etanólicos de todas as macroalgas foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante através dos ensaios DPPH, FRAP e também quanto ao seu teor fenólico total.

A atividade de eliminação do radical DPPH na concentração de $400 \mu\text{g/mL}$ do extrato etanólico de *C. osmundacea* foi a mais ativa (67,9%), embora *P. concrecens* (62,8%) e *E. arborea* (58,8%) apresentassem atividades apenas ligeiramente mais baixas. Os extratos destas três macroalgas castanhas apresentaram valores semelhantes ou superiores ao BHT usado como o antioxidante padrão neste estudo (58,9%). O ensaio FRAP foi expresso como equivalentes de μM de FeSO_4 . A macroalga *E. arborea* apresentou FRAP médio significativamente mais alto ($11,9 \mu\text{M FeSO}_4/\mu\text{g}$) que as restantes amostras, seguido por *P. concrecens* ($6,8 \mu\text{M FeSO}_4/\mu\text{g}$) e *C. osmundacea* ($5,4 \mu\text{M FeSO}_4/\mu\text{g}$). A capacidade antioxidante das macroalgas determinada por este método foi ligeiramente diferente ao encontrado quando o método foi o da captação dos radicais livres DPPH, o que pode mostrar a importância da determinação das atividades recorrendo a vários métodos. Os mecanismos da oxidação são complexos e os antioxidantes podem atuar de vários modos, como referido anteriormente (138).

O teor fenólico dos extratos etanólicos das macroalgas foi expresso como EAG. O grupo de macroalgas castanhas apresentou o maior CFT médio ($176,5 \pm 174,4 \mu\text{g EAG/g}$), pelo que os teores elevados de fenóis totais nos extratos etanólicos das macroalgas castanhas pode explicar, em parte, a maior atividade antioxidante nalgumas das macroalgas que pertenciam a

este filo. Os resultados obtidos pelos autores (138) sugerem que a atividade antioxidante pode ser devida à presença de compostos fenólicos nos extratos. Num artigo de revisão (113), os autores compilaram as atividades biológicas de moléculas marinhas que se mostravam promissoras no tratamento de problemas da pele, incluindo danos provocados por UV e envelhecimento. Em relação aos carotenoides, os autores mencionam a fucoxantina extraída de *Undaria pinnatifida*, mostrando uma maior capacidade treze vezes superior de eliminação de radicais hidroxilo do que o α -tocoferol. Já os florotaninos difloretol, trifloroetol, trifluhalol e tetrafluhalol, floroglucinol, eckol, eckstolonol presentes em *Halidrys siliquosa*, *Ecklonia cava*, *Ascoseira mirabilis*, *Cystosphaera jacquinotii*, *Ishige okamurae* tinham atividade antioxidante pois protegiam contra os RUV e eliminavam radicais. Shibata *et al.* (139) também faz referência aos florotaninos presentes em *Ecklonia cava* que foram potentes eliminadores de radicais livres e cerca de duas vezes mais eficazes que a catequina, o ácido ascórbico e o α -tocoferol. No geral, os autores concluíram que os antioxidantes marinhos são promissores na prevenção de danos da pele relacionados com raios UV. Num artigo de revisão, os autores (115) compilaram as aplicações de moléculas bioativas derivadas de algas marinhas como um potencial substituto para as suas aplicações atuais na indústria cosmética. As atividades biológicas de polissacáridos, proteínas, compostos fenólicos e pigmentos são discutidas como fontes seguras de ingredientes para o consumidor e a indústria cosmética. Nesta revisão foram mencionadas as seguintes macroalgas marinhas contendo polissacáridos que apresentam atividade antioxidante: *Saccharina japonica* (anteriormente *Laminaria japonica*), *Turbinaria ornata*, *Fucus vesiculosus* e *Turbinaria conoides*. Esta revisão também menciona o papel importante dos aminoácidos que são aplicados nas preparações cosmeceúticas como uma parte funcional, pois apresentam várias atividades, entre elas, a atividade antioxidante. Os MAAs são outros compostos que desempenham um papel importante na proteção contra danos causados pela luz solar, pois agem como moléculas antioxidantes que eliminam os radicais tóxicos de oxigênio e protegem a pele contra danos induzidos por UV. Os aminoácidos com atividade antioxidante compilados pelos autores (115) derivam das seguintes macroalgas: *Ecklonia cava*, *Pelvetia canaliculata* e *Scytosiphon lomentaria*.

Na compilação que fizeram os autores (115) referiram também que as macroalgas marinhas são ricas em vários compostos fenólicos. A catequina e alguns outros fitocompostos, como flavonóides, polifenóis e carotenoides mostraram eliminação de ERO, regulação negativa da via da proteína quinase ativada por mitogénio (PQAM), inibição de MMP e a elevação da produção de colagénio, dando-lhes uma aplicação mais ampla em cosméticos.

Os autores (115) fizeram mesmo uma compilação exaustiva sobre os grupos de compostos fenólicos presentes nas macroalgas e que apresentaram atividade antioxidante:

- compostos fenólicos totais: *Sargassum muticum*, *Ishige okamurae*, *Ecklonia cava*, *Dictyopteris undulata*, *Sargassum micracanthum*, *Sargassum macrocarpum*, *Sargassum siliquastrum*, *Anthophycus longifolius*, *Sargassum plagiophyllum*, *Sargassum myriocystum*.
- compostos fenólicos: *Fucus serratus*, *Sargassum muticum*, *Saccharina latissima*, *Laminaria digitata*, *Sargassum pacificum* (antigamente *Sargassum mangarevense*), *Turbinaria ornata*,
- Compostos fenólicos, carotenoides, flavonoides: *Gongolaria barbata* (formerly *Cystoseira barbata*), *Scytosiphon lomentaria*,
- fucoxantina: *Sargassum siliquastrum*
- florotaninos: *Sirophysalis trinodis*, *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus*, *Ecklonia stolonifera*, *Eisenia bicyclis*,
- flavonoides: *Undaria pinnatifida*
- flavonoides e florotaninos: *Ascophyllum nodosum*
- flavonoides e polifenóis: *Desmarestia ligulata*, *Dictyota kunthii*
- polifenol: *Fucus vesiculosus*
- florotaninos e polifenóis: *Fucus vesiculosus*, *Ascophyllum nodosum*, *Fucus serratus*
- floroglucinol: *Ecklonia cava*

Para além dos compostos fenólicos, os autores (115) encontraram também referências onde mostram a importância dos pigmentos (clorofilas; carotenoides, como carotenos, xantofilas, fucoxantina e peridina); e ficobilinas (ficocianina e ficoeritrina) presentes nas macroalgas como antioxidantes e fotoprotetores. Os carotenoides são amplamente aplicáveis como corantes naturais e antioxidantes com vários benefícios, entre eles, a eliminação de radicais que ajuda nos efeitos prejudiciais dos UVA. A astaxantina tem uma variedade de funções na prevenção da foto-oxidação mediada por UV, tumores e inflamação, pois elimina os radicais livres e bloqueia a produção de citocinas pró-inflamatórias. A fucoxantina tem efeitos protetores sobre a pele, tornando-a consequentemente benéfica em cosméticos.

A fucoxantina está presente na macroalga *Sargassum ilicifolium* e a fucoxantina, α -caroteno e β -caroteno presentes em *Sargassum polycistum* (115).

Liu e a sua equipa (122) avaliaram a atividade antioxidante dos florotaninos extraídos

de cinco espécies de algas *Saccharina latissima*, *Alaria esculenta*, *Laminaria digitata*, *Fucus vesiculosus* (Figura 9.3) e *Ascophyllum nodosum* (Figura 9.2). Os florotaninos extraídos foram divididos em três grupos: florotaninos solúveis (FS), florotaninos ligados à membrana (FM) e florotanino extraído ligado à membrana (FMe) e foram investigados quanto à sua atividade de eliminação de radicais DPPH. *F. vesiculosus* e *A. nodosum* apresentaram o maior rendimento de florotanino (14,83 mg-extrato/g algas e 12,80 mg-extrato/g algas, respectivamente) entre as cinco espécies de algas. O parâmetro mais utilizado para avaliar a propriedade de sequestrar radicais DPPH é o valor CE_{50} , que corresponde à quantidade de florotaninos que elimina metade dos radicais DPPH. Os extratos com menor valor de CE_{50} indicam maior atividade antioxidante,



Figura 9.3 – *Fucus vesiculosus* (Retirado de (134)).

como já referido anteriormente. Os autores concluíram que os extratos FS de *A. nodosum* e *F. vesiculosus* apresentaram melhor atividade antioxidante do que as outras três espécies, indicando que existem diferenças significativas no conteúdo de florotaninos entre as diferentes espécies de algas. Os extratos de FS e FM de *A. nodosum* demonstraram exercer uma atividade maior de eliminação de DPPH* ($CE_{50} = 6,3-7,7 \mu\text{g/mL}$) do que BHT ($CE_{50} = 51 \mu\text{g/mL}$) e aqueles de *F. vesiculosus* ($CE_{50} = 3,8-4,7 \mu\text{g/mL}$) foram ainda mais fortes do que o ácido ascórbico ($CE_{50} = 6,3 \mu\text{g/mL}$) (122). Da mesma forma, um extrato purificado de florotanino de *F. vesiculosus*, exibiu uma atividade de eliminação de DPPH* melhor do que α -tocoferol ($CE_{50} = 3,76$ contra $5,93 \mu\text{g/mL}$) e comparável ao do BHT ($CE_{50} = 3,28 \mu\text{g/mL}$) (122). Os compostos presentes nas macroalgas podem ser polares ou hidrofílicos (por exemplo, florotaninos), semipolares (por exemplo, ácidos fenólicos e flavonoides simples) ou apolares ou lipofílicos (por exemplo, carotenoides, ácidos gordos). A extração dos compostos bioativos está associada à polaridade dos solventes (polares/semipolares) utilizados, bem como à sua complexidade com outros constituintes, pelo que, encontrar um sistema solvente adequado para a extração de todas as classes ou uma classe específica de antioxidantes é restringido pela natureza química desses compostos bioativos. Os compostos lipofílicos das algas marinhas têm sido associados à sua bioatividade potencial, pelo que para a obtenção de extratos enriquecidos em compostos

lipofílicos, é de fundamental selecionar sistemas solventes de extração eficientes para melhorar a sua extração e manter a estabilidade (140).

Num estudo realizado por Rajauria (140) foram utilizados solventes de baixa polaridade, como clorofórmio, éter dietílico, *n*-hexano e as suas várias combinações para extrair os antioxidantes lipofílicos de algas castanhas, nomeadamente, *Laminaria saccharina*, *Laminaria digitata* e *Himanthalia elongata* (Figura 9.4) provenientes da Irlanda. O objetivo deste estudo foi o de selecionar o sistema solvente mais adequado para a extração desses compostos lipofílicos e avaliar a sua capacidade antioxidante.



Figura 9.4 – (A): *Laminaria saccharina*; (B): *Laminaria digitata*; (C): *Himanthalia elongata* (Adaptado de (140)).

Extratos lipofílicos brutos de algas marinhas foram selecionados para conteúdo fenólico total (CFT), conteúdo de flavonoides total (CFIT), conteúdo de clorofila total (CCIT) e conteúdo total de carotenoides (CCT). Os resultados do CFT foram expressos em mg EAG/g de extrato de p.s. CFIT foi expresso em mg equivalentes de quercetina (EQ)/g de extrato p.s. Os resultados do CCIT e CCT foram expressos em $\mu\text{g/g}$ de p.s.

Os extratos obtidos com *n*-hexano exibiram o menor CFT (variou de $7,7 \pm 0,64$ a $14,1 \pm 0,79$ mg EAG/g) enquanto os extratos dos solventes usando uma mistura de *n*-hexano, éter dietílico e clorofórmio (igual volume de cada solvente) apresentaram o maior CFT (variando de $52,7 \pm 1,93$ a $180,2 \pm 1,84$ mg EAG/g) em todas as espécies estudadas. A maior diferença ($p < 0,05$) na quantidade de CFT foi obtida em *H. elongata* seguida por *L. saccharina* e *L. digitata* com o sistema de solventes. No caso de flavonoides totais, os resultados mostraram que o CFIT em algas marinhas variou consideravelmente com a polaridade do solvente. O CFIT dos extratos obtidos de diferentes solventes de baixa polaridade e suas misturas variaram de $11,3 \pm 2,5$ a $131,3 \pm 4,51$ mg EQ/g em *H. elongata*, $6,9 \pm 0,88$ a $56,3 \pm 1,77$ mg QE/g em *L. saccharina* e $4,4 \pm 0,88$ a $31,9 \pm 2,65$ mg QE/g em *L. digitata*. O extrato obtido com a mistura

des solventes atrás referida exibiu o maior CFIT em *H. elongata* seguido por *L. saccharina* e *L. digitata*. No entanto, o extrato obtido com *n*-hexano apresentou o menor CFIT em todas as espécies de algas marinhas. Os resultados revelaram que o sistema pela mistura dos três solventes produziu CCT significativamente maior em *H. elongata* seguido por *L. digitata* e *L. saccharina*, enquanto os extratos de *n*-hexano apresentaram os menores valores entre as algas testadas (140). No caso do teor de clorofila, o extrato de clorofórmico de *L. digitata* exibiu o maior CCIT enquanto o extrato de *H. elongata* apresentou o menor CCIT.

As maiores recuperações de antioxidantes lipofílicos de amostras de algas marinhas foram obtidas a partir da mistura de solventes usando uma técnica de extração por solvente (140).

Os extratos lipofílicos das três algas testadas, obtidos de vários solventes e das suas misturas, foram selecionados quanto à sua capacidade antioxidante através dos ensaios DPPH, FRAP e da capacidade quelante de íons metálicos. Relativamente à eliminação dos radicais DPPH pelos extratos de algas foi dose-dependente. Os resultados interpretaram que os valores de CE₅₀ de todos os extratos obtidos de diferentes solventes foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) para cada espécie de alga marinha. Os extratos da mistura de solventes (hexano, éter dietílico e clorofórmio) exibiram a maior eliminação, enquanto os extratos de *n*-hexano representaram a capacidade de eliminação mais baixa contra radicais DPPH. Os extratos de *H. elongata* apresentaram a maior capacidade de eliminação (CE₅₀ $98,3 \pm 2,78 \mu\text{g/mL}$), seguida por *L. saccharina* (CE₅₀ $222,4 \pm 0,84 \mu\text{g/mL}$) e *L. digitata* (CE₅₀ $298,8 \pm 5,81 \mu\text{g/mL}$). A capacidade de eliminação do ácido ascórbico padrão (EC₅₀ $50,6 \pm 0,79 \mu\text{g/mL}$) foi maior do que os extratos de algas marinhas (140).

Quanto ao ensaio FRAP, a capacidade de redução de todos os extratos foi significativamente diferente dentro de cada espécie e variou de $5,5 \pm 0,20$ a $26,3 \pm 0,30$ mg ET/g p.s. de extrato em *H. elongata*, $1,6 \pm 0,06$ a $10,9 \pm 0,29$ mg ET/g p.s. de extrato em *L. saccharina* e $1,7 \pm 0,06$ a $8,3 \pm 0,23$ mg TE/g p.s. de extrato em *L. digitata*. Dos extratos testados, os extratos obtidos com a mistura de solventes exibiram o maior e estatisticamente diferente ($p < 0,05$) valor de FRAP em *H. elongata* seguido por *L. saccharina* e *L. digitata*, enquanto o extrato obtido do *n*-hexano apresentou o menor poder redutor nas algas testada (140).

Relativamente ao ensaio de capacidade quelante de íons metálicos, que é baseado na formação do complexo íon ferroso-ferrozina de cor azul que tem uma absorvância máxima a 562 nm foi também avaliado pelos autores (140). O EDTA foi usado como um composto padrão. Neste ensaio, a formação do complexo Fe²⁺-ferrozina é interrompida na presença de

vários extratos de algas castanhas. A absorção deste complexo diminuiu linearmente de forma dose-dependente. Todos os extratos apresentaram alto nível de capacidade quelante de íons metálicos, mas foram significativamente menores em comparação ao EDTA. Entre todos os solventes testados, o extrato com a mistura de solventes apresentou a maior capacidade quelante enquanto os extratos obtidos com *n*-hexano apresentaram a menor capacidade quelante de metal em qualquer concentração testada. Em contraste com a atividade de eliminação de FRAP e DPPH, a capacidade quelante de metal foi registada mais alta em espécies do género *Laminaria* em comparação com *H. elongata*. A percentagem da capacidade quelante de metal de todos os extratos na concentração de 1000 µg/mL variou entre 22,7 e 57,8% em *H. elongata*, 48,9 a 81,9% em *L. digitata* e 52,8 a 82,3% em *L. saccharina*, enquanto o padrão EDTA exibiu capacidade quelante de quase 100%, mesmo em concentrações muito baixas (125 µg/mL) (140).

De acordo com os resultados, os autores (140) concluíram que extratos lipofílicos de macroalgas castanhas irlandesas, *H. elongata*, *L. saccharina* e *L. digitata* exibiam forte propriedade antioxidante e capacidade quelante de íons metálicos. A capacidade antioxidante era afetada principalmente pela polaridade dos solventes de extração e a maior capacidade antioxidante foi obtida por uma mistura de igual volume de *n*-hexano, éter dietílico e clorofórmio em todas as macroalgas estudadas. Entre todas as espécies testadas, *H. elongata* foi a espécie que apresentou a maior capacidade antioxidante seguida por *L. saccharina* e *L. digitata*. Essas descobertas indicam que pode ser vantajoso caracterizar ainda mais estes compostos nestes extratos, pois podem ser usados em produtos farmacêuticos, alimentos e cosméticos para atuar como antioxidantes (140).

As macroalgas castanhas *Dictyota dichotoma* e *Padina pavonica* (Dictyotaceae) são espécies amplamente distribuídas no Mar Adriático. O estudo realizado por Mekinić e a sua equipa (133) teve como objetivo investigar o potencial biológico de *D. dichotoma* e *P. pavonica* e o impacto do modo de extração (ultrassom, solvente e regime de temperatura) no seu perfil fenólico. Além disso, a relação entre o perfil fenólico das algas e a atividade foi investigada a fim de encontrar os parâmetros de extração mais adequados para a produção de extratos bioativos. O CFT nas amostras foi determinado pelo método Folin e os resultados foram expressos como mg EAG/L. Os flavonoides totais foram também avaliados e os resultados expressos mg EQ/L. Os taninos foram quantificados usando o método da vanilina-HCl, sendo usado a catequina como padrão e os resultados expressos em mg equivalentes de catequina por litro de extrato (mg EC/L).

Os extratos foram analisados para os principais subgrupos fenólicos (fenólicos totais,

flavonoides e taninos) pelo método Folin-Ciocalteu, enquanto os fenólicos individuais foram detetados por HPLC. As atividades antioxidantes foram avaliadas através de três métodos: FRAP, eliminação do radical DPPH e ORAC. Os resultados obtidos pelo método FRAP e ORAC são expressos em milimoles de ET, já os resultados das reações de eliminação dos antioxidantes com DPPH são expressos em micromoles de ET (133).

O CFT apresentou como valor mínimo 127 mg EAG/L no extrato aquoso de *D. dichotoma* preparado a 40°C e um valor máximo de 423 mg EAG/L no extrato etanólico de *P. pavonica*. Os extratos preparados à temperatura ambiente (TA) em quase todos os casos, exceto nos extratos etanólicos de *P. pavonica*, apresentaram os maiores teores em fenóis. A participação dos fenólicos nos extratos etanólicos de *D. dichotoma* preparados à TA foi 29% maior do que nos extratos aquosos e 56% e 46% maior nos extratos etanólicos preparados a 40 e 60 °C, respetivamente. Embora não tenha havido diferenças significativas entre o potencial fenólico dos extratos aquosos de *D. dichotoma* e *P. pavonica*, o conteúdo de fenólicos nos extratos etanólicos foi significativamente maior. Os extratos etanólicos eram mais ricos nestes compostos, especialmente os extratos de *D. dichotoma* (faixa de concentração de 871 mg EQ/L no extrato preparado a 60 °C e 975 mg EQ/L no extrato preparado à TA). Resultados semelhantes foram obtidos para os taninos totais, onde, novamente, as maiores quantidades desses compostos foram detetadas nos extratos etanólicos de *D. dichotoma* (de 0,34 a 0,39 mg EC/L) (133).

Os ácidos fenólicos individuais identificados nos extratos de *D. dichotoma* e *P. pavonica* detetados por HPLC foram o ácido protocatecuico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido *p*-cumárico, ácido *trans* ferúlico e ácido *o*-cumárico. O ácido fenólico dominante nos extratos de *D. dichotoma* foi o ácido *trans*-ferúlico com maiores concentrações no extrato etanólico preparado à TA. Em *P. pavonica*, o fenólico dominante foi o ácido protocatecuico. Embora o ácido *trans*-ferúlico também tenha sido encontrado nos extratos de *P. pavonica*, a sua concentração foi significativa apenas no extrato aquoso preparado à TA (1,22 mg/L). Resultados semelhantes foram obtidos no extrato de *D. dichotoma*, onde a maior concentração foi detetada no extrato etanólico preparado a 20°C (2,07 mg/L). Geralmente, as concentrações de derivados do ácido hidroxicinâmico (ácido *p*-cumárico, *o*-cumárico e *trans* ferúlico) foram maiores nos extratos de *D. dicotoma*, enquanto os extratos de *P. pavonica* foram mais ricos em ácidos hidroxibenzóico (protocatecuico e *p*-hidroxibenzóico) (133).

O conteúdo de floroglucinol também foi avaliado e os extratos de *D. dichotoma* foram mais ricos neste composto, com teor quase três vezes maior nos extratos aquosos do que nos extratos etanólicos. Por outro lado, os extratos etanólicos de *P. pavonica* continham quantidades

significativamente menores de floroglucinol e a sua quantificação nos extratos aquáticos não foi possível (estava presente, mas em quantidade abaixo do limite de quantificação). Devido à presença de florotaninos, foi relatado que as espécies de algas castanhas possuem maior atividade antioxidante do que as algas verdes e vermelhas (133).

No mesmo estudo (133), a atividade antioxidante foi avaliada através de uma abordagem de métodos múltiplos, usando três ensaios. No ensaio FRAP, as maiores atividades foram detetadas para os extratos etanólicos de *D. dichotoma* (de 690 a 792 mM ET), enquanto todas as outras amostras tiveram uma atividade três vezes menor. Relativamente ao ensaio DPPH, foi detetada uma atividade muito baixa das amostras, sendo os extratos etanólicos de *P. pavonica* os mais ativos (de 501 a 645 µM TE). No método ORAC, os resultados dos extratos etanólicos foram superiores em comparação com os extratos aquosos de ambas as espécies de algas. Enquanto a atividade dos extratos etanólicos de *P. pavonica* foi cerca de duas vezes maior do que a atividade dos extratos aquosos, os extratos etanólicos de *D. dichotoma* mostraram excelente atividade. Para a obtenção dos resultados, esses extratos foram previamente diluídos a 1: 400.

Os autores do estudo (133) concluíram que as algas castanhas são uma fonte valiosa de compostos biologicamente ativos, nomeadamente compostos fenólicos, sendo os extratos etanólicos os que continham maiores concentrações. *D. dichotoma* continha concentrações mais altas de derivados do ácido hidroxicinâmico, enquanto *P. pavonica* era mais rica em ácidos hidroxibenzóicos. Os extratos testados também apresentaram bom potencial antioxidante nos três ensaios antioxidantes, sendo os flavonoides e taninos provavelmente os responsáveis pela atividade. Segundo os mesmos autores (133), é importante a investigação do perfil fenólico destas macroalgas para que possam ser usadas na indústria cosmética/farmacêutica.

No artigo de revisão (141), os autores compilaram numa lista os compostos bioativos de *Sargassum* recolhida em diferentes locais da Indonésia e que apresentam atividade antioxidante. *S. filipendula*, *S. duplicatum*, *S. crassifolium*, *S. hystrix*, *S. polycystum*, *S. binderi*, *S. angustifolium*, *S. cristaefolium*, *S. aquifolium*, *S. ilicifolium*, *S. polycystum* são exemplos de macroalgas que apresentam polifenóis na sua composição química e têm atividade antioxidante

Num outro artigo de revisão (142), os autores fizeram referência ao predomínio da fucoxantina nas macroalgas deste filo com propriedades antioxidantes. Além deste composto, as macroalgas castanhas também apresentavam fucoidano podendo ser utilizado em produtos para a pele porque apresentava propriedades hidratantes, antienvhecimento e anticelulite. Os autores chegam a mencionar *Undaria pinnatifida*, como sendo uma macroalga rica em fucoidano e que é utilizada em produtos para a pele já que apresenta propriedades

antienvelhecimento, despigmentantes e hidratantes.

O artigo realizado por Sarmiento-Padilla e a sua equipa (143) é focado na importância do composto bioativo fucoxantina. Os autores mencionaram correlações positivas entre o teor de fucoxantina e a atividade antioxidante. Neste artigo (143), os autores fizeram referência a um estudo realizado por Wang *et al.* em que mostravam que o pré-tratamento com fucoxantina poderia aumentar a viabilidade das células L02 hepáticas humanas em comparação com o grupo modelo (célula sem pré-tratamento), sugerindo um efeito protetor da fucoxantina contra o dano celular induzido por H₂O₂. Como resultado, neste estudo foi observado um aumento de duas vezes no conteúdo de glutatona intracelular e uma redução de 58% nas ERO intracelulares em células pré-tratadas com fucoxantina. Estes resultados sugeriram que o efeito protetor da fucoxantina contra danos de H₂O₂ em células L02 é devido, pelo menos em parte, à sua capacidade de eliminação de ERO e indução de conteúdo de GSH, que também pode participar da eliminação de ERO.

O artigo de revisão realizado por Lourenço-Lopes *et al.* (144) reforça a informação do artigo anterior, pois os autores referem que a fucoxantina atrai muitas atenções devido às suas fortes propriedades antioxidantes, entre outras. Além disso, os autores mencionam que a fucoxantina demonstra ótimos resultados contra a RUV e é capaz de proteger as camadas dérmicas. Essa proteção tem sido associada à remediação de danos ao ADN e à potente atividade antioxidante da fucoxantina em células fibroblásticas humanas. Estes resultados parecem indicar que aplicação tópica de fucoxantina pode prevenir ou mesmo reduzir os efeitos negativos induzidos pela exposição à RUV. Devido à sua capacidade antioxidante, a fucoxantina foi testada em várias formulações cosméticas anti-envelhecimento e protetores solares. Os autores concluíram nesta revisão (144) que a fucoxantina é considerada uma molécula valiosa devido a sua ampla gama de propriedades benéficas, como atividade antioxidante ou propriedades fotoprotetoras e que é um pigmento interessante com aplicações industriais promissoras nos setores cosmético e farmacêutico. No entanto, a comercialização de fucoxantina é escassa, o que limita muito o seu uso posterior. Neste sentido, a extração da fucoxantina de macroalgas castanhas seria uma hipótese, pois o acesso a estes organismos é fácil e económico e evita os problemas de segurança decorrentes do uso de compostos químicos de síntese.

9.2 Macroalgas verdes – Filo Chlorophyta

No artigo de revisão (142), os autores mencionam que as macroalgas verdes apresentam cor verde pois nenhum outro pigmento “esconde” a clorofila. Na realidade, estas algas possuem clorofilas (a e b) e carotenoides (β -caroteno e xantofilas), que são importantes na proteção contra os efeitos nocivos provocados pela irradiação, apresentando uma atividade antioxidante. Além disso, os autores referem que este filo possui na sua composição ulvana que apresentam inúmeras atividades, entre elas, atividade antioxidante. Hentati *et al.* (145) também fazem referência a ulvanas isoladas de *Ulva pertusa* por possuírem grandes propriedades antioxidantes relacionadas ao conteúdo de sulfato.

Os autores (138) quiseram estudar a capacidade antioxidante de 17 macroalgas, sendo quatro delas macroalgas verdes: *Codium amplivesiculatum*, *Codium simulans*, *Cladophora spp.* e *Ulva dactylifera* provenientes da Península de Baja Califórnia, no México. Os extratos etanólicos de todas as macroalgas foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante através dos ensaios DPPH, FRAP e também quanto ao seu CFT. Relativamente à atividade de eliminação do radical DPPH, os autores não referem resultados para as macroalgas verdes, pois não apresentaram valores semelhantes ou superiores ao BHT usado como o antioxidante padrão neste estudo. A dependência da concentração da atividade antioxidante também foi investigada nos 17 extratos e nenhuma macroalga verde foi referenciada pelo que nenhuma foi capaz de eliminar o DPPH de uma maneira dependente da dose. Nenhuma das quatro macroalgas se destacou com um elevado valor de FRAP, tendo sido este grupo de macroalgas a apresentar a menor média de valor de FRAP ($2,6 \pm 0,83 \mu\text{M FeSO}_4/\mu\text{g}$)

O CFT dos extratos etanólicos das macroalgas foi expresso como EAG. Aqui, também as macroalgas verdes apresentaram o menor valor médio ($32,7 \pm 17,82 \mu\text{g EAG/g}$) quando comparadas com as restantes macroalgas castanhas. Os resultados obtidos pelos autores (138) sugerem que a atividade antioxidante pode ser devida à presença de compostos fenólicos nos extratos, como tal, é plausível a quase inexistência de atividade antioxidante de macroalgas verdes pois este filo apresenta valores diminuídos de CFT.

Num artigo de revisão, os autores (115) compilaram as aplicações de moléculas bioativas derivadas de algas marinhas como um potencial substituto para as suas aplicações atuais na indústria cosmética. As atividades biológicas de polissacáridos, proteínas, compostos fenólicos e pigmentos são discutidas como fontes seguras de ingredientes para o consumidor e a indústria cosmética. Os polissacáridos sulfatados são atraentes nas atividades cosmeceúticas

e nesta revisão foram mencionadas três macroalgas verdes contendo polissacáridos que apresentam atividade antioxidante: *Ulva australis* (anteriormente *Ulva pertusa*), *Ulva linza* (anteriormente *Enteromorpha linza*) e *Bryopsis plumosa*.

Os MAAs são outros compostos que desempenham um papel importante na proteção contra danos causados pela luz solar, pois agem como moléculas antioxidantes que eliminam os radicais tóxicos de oxigênio e protegem a pele contra danos induzidos por UV. *Ulva prolifera* é mencionada pelos autores por conter aminoácidos com atividade antioxidante (115).

Na compilação que fizeram, os autores (115) referiram também que as macroalgas marinhas são ricas em vários compostos fenólicos. A catequina e alguns outros fitocompostos, como flavonóides, polifenóis e carotenoides mostraram eliminação de ERO, regulação negativa da via da PQAM, inibição de MMP e a elevação da produção de colagénio, dando-lhes uma aplicação mais ampla em cosméticos.

Os autores (115) fizeram mesmo uma compilação exaustiva sobre os grupos de compostos fenólicos presentes nas macroalgas e que apresentaram atividade antioxidante:

- ácido fenólico: *Halimeda macroloba*, *Halimeda opuntia*, *Halimeda monile*
- compostos fenólicos: *Cladophora vagabunda*, *Ulva intestinalis* (antigamente *Enteromorpha intestinalis*) *Cladophora rupestris*, *Codium fragile*,
- florotaninos: *Ulva lactuca*
- flavonoides: *Acetabularia ryukyuensis*

No estudo desenvolvido por alguns autores (146) foi avaliado o potencial biotecnológico de 26 espécies de macroalgas marinhas, das quais sete são macroalgas verdes, das lagoas de ilhas vulcânicas da Polinésia Francesa, ou seja, Taiti, Moorea e Tubuai. O CFT foi determinado através do ensaio FC e as atividades antioxidantes foram avaliadas através do ensaio DPPH, FRAC e ORAC. O CFT variou significativamente dependendo das espécies e frações. O nível mais alto de CFT por extrato foi encontrado em *Caulerpa sertularioides* e *Halimeda macroloba* para as macroalgas verdes (49,03 e 40,84 mg EAG/g p.s. extrato, respetivamente). As atividades de eliminação do radical DPPH das frações foram baixas em comparação com a CE₅₀ dos controlos positivos. No entanto, as espécies apresentaram uma elevada percentagem de inibição de DPPH, próxima à do BHA (>80%): cinco macroalgas verdes *Chlorodesmis fastigiata*, *Halimeda macroloba*, *Caulerpa chemnitzia*, *Caulerpa sertularioides* e *Caulerpa taxifolia* (90,2%, 80,7%, 82,5%, 88,6% e 89,0%, respetivamente). Relativamente à atividade de eliminação, os valores de CE₅₀ dos controlos positivos foram de 0,0031 mg mL⁻¹ para o BHA e de 0,0057 mg/mL para o ácido ascórbico e o CE₅₀ mais baixo encontrado em extratos de

macroalgas verdes de *Caulerpa chemnitzia* (0,35 mg/mL), isto é, atividade muito inferior quando comparada com as dos controlos. No ensaio FRAP, as amostras apresentaram atividade antioxidante considerável em três frações de macroalgas verdes *C. sertularioides*, *C. fastigiata* e *H. macroloba*. Este estudo destacou um potencial antirradical ou antioxidante marcante de cinco macroalgas verdes (*C. chemnitzia*, *C. sertularioides*, *C. taxifolia*, *C. fastigiata* e *H. macroloba*), da Polinésia Francesa (146). *Ulva intestinalis* (Figura 9.5) é amplamente distribuída na costa sul da Tailândia. Esta alga marinha é muito utilizada para rações animais, fertilizantes e alimentos humanos. Srikong *et al.* (147) avaliaram a atividade antioxidante e o conteúdo fenólico de extratos brutos de *U. intestinalis* através de extrações com diferentes solventes. Os extratos de algas foram preparados por maceração com metanol, etanol, diclorometano e hexano e foram realizados dois ensaios para determinar a atividade antioxidante de *U. intestinalis*, nomeadamente DPPH e ABTS.



Figura 9.5 – *Ulva intestinalis*. (Retirado de (134)).

Relativamente à percentagem de eliminação de radicais DPPH, a atividade antioxidante foi avaliada para os quatro extratos de *U. intestinalis* e cada um mostrou diferenças significativas na atividade de eliminação do radical DPPH ($p < 0,05$), sendo os extratos de diclorometano de *U. intestinalis* aqueles que possuíram a maior percentagem de inibição do radical DPPH ($87,54 \pm 0,11\%$), seguido por extratos de etanol ($31,9 \pm 0,4\%$), metanol ($22,6 \pm 0,8\%$) e, por último, extratos de hexano ($22,5 \pm 0,2\%$). Quanto ao valor de concentração inibitória 50% (CI₅₀) dos extratos de algas, neste ensaio, também os extratos de diclorometano apresentaram os melhores resultados ($0,92 \text{ mg/ml}$) (147).

As atividades de eliminação de radicais livres dos quatro extratos de *U. intestinalis*, avaliadas pelo teste ABTS, também mostraram diferenças significativas. Os resultados mostraram que, entre os quatro extratos, o extrato de diclorometano apresentou maior atividade de ABTS ($61,9 \pm 1,3\%$) e menor valor de CI₅₀ de $1,50 \text{ mg/ml}$.

O teor de conteúdo fenólico variou de $54,4 \pm 0,3$ a $197 \pm 16 \text{ mg}$ de extrato de EAG/g,

tendo sido observado o maior índice fenólico com o extrato de diclorometano (197±16 mg EAG/g) seguido pelos extratos de hexano, etanol e metanol. Geralmente, o maior teor de fenólicos totais resultou numa maior atividade antioxidante, pelo que a determinação das atividades antioxidantes (DPPH e ABTS) do extrato de diclorometano foi semelhante à do CFT. Para o *U. intestinalis* extraído com diferentes solventes, o solvente mais eficiente para extração fenólica e atividade de eliminação de radicais foi o diclorometano (147).

Os autores (147) do estudo concluíram que os resultados obtidos confirmam que a alga marinha *U. intestinalis* é uma fonte potencial de compostos bioativos, mas principalmente para a eliminação de radicais livres, pelo que esta alga comestível possui um potencial antioxidante adequado e deve ser considerada para futuras aplicações na indústria de cosméticos.

9.3 Macroalgas vermelhas – Filo Rhodophyta

Vega. *et al.* (63) avaliaram as propriedades antioxidantes e fotoprotetoras de extratos de macroalgas vermelhas (*Porphyra umbilicalis*, *Gracilariopsis longissima*, *Gelidium corneum*, *Osmundea pinnatifida* e *Ceramium rubrum*), utilizando solventes de extração passíveis de poderem ser usados em cosméticos (água, etanol e combinação de água: etanol). Os conteúdos de MAAs, polifenóis e ficobiliproteínas foram avaliados em todas as espécies testadas.

A atividade antioxidante dos diferentes extratos foi avaliada através de dois métodos diferentes baseados na atividade de eliminação de radicais livres, ABTS e DPPH. Para ambos os métodos, uma solução padrão de Trolox foi usada como referência e os resultados foram expressos como $\mu\text{mol ET/g p.s.}$. Os resultados da atividade antioxidante através do ensaio ABTS foram mais elevados do que no ensaio DPPH e, entre os solventes, também se verificaram diferenças. Os valores mais elevados com o ensaio ABTS foram observados em *O. pinnatifida* e *P. umbilicalis*. Em *O. pinnatifida*, o maior valor foi obtido com o solvente etanol:H₂O (4:1) (14 $\mu\text{mol ET/g p.s.}$), já com *P. umbilicalis* o valor mais elevado foi com a água (12,5 $\mu\text{mol ET/g p.s.}$). Os maiores valores com o método DPPH foram observados em *G. corneum* e *O. pinnatifida*, ambos a utilizar o solvente etanol: H₂O (4:1) (aproximadamente 4 $\mu\text{mol ET/g p.s.}$) (63)

Os autores (63) atribuíram as atividades com capacidade antioxidante e fotoprotetora aos MAAs e aos compostos fenólicos. As maiores concentrações de MAAs foram encontradas em *P. umbilical* (5.2 mg/g p.s.), *G. corneum* (1.8 mg/g p.s.) e *O. pinnatifida* (1.5 mg/g p.s.) e o maior teor de polifenóis foi observado no extrato aquoso de *P. umbilicalis* (aproximadamente

13 mg/g p.s.), porque encontram correlações positivas entre a atividade antioxidante e a presença de polifenóis e MAAs. Segundo os autores (63), o estudo mostrou a possível utilidade de extratos de diferentes espécies de macroalgas vermelhas em cosmecêuticos, devido à sua capacidade antioxidante e fotoprotetora. Além disso, *P.umbilicalis* pareceu ser um bom candidato para aplicações cosméticas devido ao seu alto conteúdo em MAAs e polifenóis e, portanto, com possibilidades de serem cultivadas. Rangel e a sua equipa (148) avaliaram o potencial fotoprotetor e a capacidade antioxidante de macroalgas vermelhas recolhidas no continente Antártico. Os extratos de *Curdiea racovitzae* e *Iridaea cordata* contêm principalmente palitina e asterina-330, dois MAAs. O extrato de *C. racovitzae* apresentou uma maior concentração de MAAs do que o extrato de *I. cordata*.

A capacidade antioxidante dos extratos de algas vermelhas foi estudada através de dois métodos, DPPH e eliminação do radical superóxido. O flavonoide quercetina foi usado como padrão nos ensaios antioxidantes devido à sua conhecida atividade antioxidante. Os extratos das três macroalgas apresentaram menor atividade antioxidante do que a quercetina em ambos os ensaios, mas a quercetina é um composto puro em comparação aos extratos que são uma mistura complexa de MAAs presentes em menor quantidade. O extrato de *C. racovitzae* tem maior atividade antioxidante do que o extrato de *I. cordata* em ambos os ensaios, indicando uma correlação entre a atividade antioxidante e a concentração de MAAs (extrato de *C. racovitzae*: 150,17 µg MAAs/mg de extrato; extrato de *I. cordata*: 60,78 µg MAAs/mg de extrato). Ao observar a diferença de valores de CE₅₀ no ensaio de DPPH e de eliminação de radicais superóxido, verificou-se que os valores foram cerca de 10 vezes menores no ensaio de eliminação de radicais superóxido. Este facto pode ser explicado pelo facto de o ensaio de eliminação do radical superóxido abordar as principais ERO produzidas em organismos vivos, em contraste com o radical livre DPPH indisponível e, portanto, é um ensaio mais preditivo para ser usado na investigação da atividade antioxidante em condições fisiológicas (148).

A fotoproteção relativamente aos raios UVA foram estudados através da quantificação de ERO intracelulares induzidas por UVA pelo método Diacetato de dicloro-dihidro-fluoresceína (DCFH₂-DA) em células queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). Quercetina foi usada como controlo. O extrato de *C. racovitzae* induziu uma redução estatisticamente significativa de ERO de 31% a 100 µg/mL, quando comparado às células irradiadas não tratadas (148).

Dos dois extratos, apenas *C. racovitzae* induziu uma redução estatisticamente significativa de ERO de 31% a 100 µg/mL, enquanto a quercetina induziu uma redução de 14% a 10 µg/mL e Helioguard 365[®] a 3% (equivalente a 30 µg MAAs/mL) (17%) com uma diferença

estatisticamente significativa desses outros grupos ($p < 0,001$). Desta forma, o extrato de *C. racovitzae* é um bom candidato a ser adicionado a formulações antienvhecimento e de filtro solar, a fim de proteger contra o stresse oxidativo (148). Ramdani *et al.* (149) determinaram a atividade antioxidante e a valorização das algas indígenas da lagoa Nador em Marrocos. Para isso, foi avaliado o potencial antioxidante dos extratos etanólicos e aquosos de *Gracilaria bursa-pastoris* (Figura 9.6) medindo a atividade de eliminação do radical DPPH e o conteúdo total de fenóis, flavonoides e flavonóis em cada extrato. Este estudo mostrou que esta macroalga contém um alto conteúdo fenólico total (142,26 e 79,43 mg/g de extrato EAG) para os extratos etanólico e aquoso, respetivamente. Todos os extratos exibiram atividade eliminadora do radical DPPH, e os extratos etanólicos demonstraram grande potencial antioxidante com valor muito baixo de CE_{50} (0,085 mg/mL), significativamente equivalente a CE_{50} (0,028 mg/mL) do ácido ascórbico, antioxidante comercial que foi usado como referência. Os autores concluíram que o extrato etanólico rico em compostos fenólicos exibiu maior atividade antioxidante. A macroalga vermelha *G. bursa-pastoris* tem um grande potencial antioxidante que pode ser considerado para futuras aplicações na medicina, produção de alimentos ou indústria cosmética em Marrocos.



Figura 9.6 - *Gracilaria bursa-pastoris*. (Retirado de (149)).

Os autores (138) quiseram estudar a capacidade antioxidante de 17 macroalgas provenientes da Península de Baja Califórnia, no México. Entre elas, cinco macroalgas são vermelhas: *Acanthophora spicifera*, *Amphiroa valonioides*, *Gelidium robustum*, *Neorhodomela larix*, *Rodhymenia californica*. Os extratos etanólicos de todas as macroalgas foram avaliados quanto ao seu potencial antioxidante através dos ensaios DPPH, FRAP e também quanto ao seu conteúdo fenólico total (CFT).

Relativamente atividade de eliminação do radical DPPH na concentração de 400 μ g/mL, as macroalgas vermelhas apresentaram atividade abaixo de 50%, enquanto o antioxidante padrão utilizado neste estudo, o BHT, apresentou um valor de 58,9%. A dependência da

concentração da atividade antioxidante também foi investigada nos 17 extratos e *A. spicifera* e *G. robustum* foram capazes de eliminar o DPPH de uma maneira dependente da dose, contudo para estas duas algas só foi possível calcular o EC₃₅ (20,3 e 355,2 µg/mL, respetivamente) porque em concentrações de extrato superiores a 100 µg/mL, a capacidade de eliminação diminuiu ou não mudou.

O ensaio FRAP foi expresso como equivalentes de µM de FeSO₄. A macroalga *A. spicifera* (9,8 µM FeSO₄/µg) apresentou o segundo valor mais elevado de FRAP. Enquanto grupo, as macroalgas vermelhas como um grupo tiveram o segundo maior valor de FRAP, com uma média combinada de 3,1 ± 3,5 µM de FeSO₄/µg.

O CFT dos extratos etanólicos das macroalgas foi expresso como EAG. O grupo de macroalgas vermelhas (45,6 ± 30,2 µg EAG/g) ficou em segundo lugar em termos de apresentação de CFT. Os resultados obtidos pelos autores (138) sugerem que a atividade antioxidante pode ser devida à presença de compostos fenólicos nos extratos e que existem filós com maior antioxidante do que as macroalgas vermelhas. O litoral marroquino possui recursos abundantes de diversas algas marinhas, mas a bioatividade de muitas dessas algas ainda não foi explorada. O objetivo do estudo desenvolvido por alguns autores (137) foi contribuir para a avaliação do potencial antioxidante, utilizando diferentes sistemas *in vitro* de cinco espécies de algas mais dominantes na costa atlântica marroquina, sendo apenas uma delas pertencente a este filo: *Gelidium sesquipedale*, pertencendo as restantes às macroalgas castanhas. Foram determinados os compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante para além de outras atividades (atividades anticolinesterásica, anti-tirosinase e anti-urease). Os resultados mostraram que *G. sesquipedale* era a segunda macroalga a possuir os maiores teores de compostos fenólicos, contudo, relativamente ao seu conteúdo de flavonoides esta macroalga apresenta um valor diminuído, ficando em quarto lugar em comparação com as demais.

A atividade de eliminação do DPPH de *G. sesquipedale* (CE₅₀: 84,61 ± 3,9 µg/mL) foi a terceira melhor e valores dos compostos de referências foram de CE₅₀: 12,26 ± 0,07 µg/mL para o α-tocoferol, CE₅₀: 54,96 ± 0,99 µg/mL para BHT e de CE₅₀: 2,07 ± 0,11 µg/mL para quercetina. As duas primeiras eram macroalgas castanhas, já referidas na secção anterior.

Quanto à eliminação ou captação dos radicais ABTS, *G. sesquipedale* (CE₅₀: 44,46 ± 2,4 µg/mL) exibiu um bom resultado, mas inferior aos de α-tocoferol (CE₅₀: 4,87 ± 0,56 µg/mL), BHT (CE₅₀: 4,10 ± 0,06 µg/mL) e quercetina (CE₅₀: 1,18 ± 0,03 µg/mL).

No teste de co-oxidação do β-caroteno / ácido linoleico, nenhum dos extratos de algas marinhas apresentou melhor atividade do que os padrões antioxidantes (α-tocoferol (CE₅₀: 2,10 ± 0,08 µg/mL), BHT (CE₅₀: 1,34 ± 0,09 µg/mL) e quercetina (CE₅₀: 1,80 ± 0,10 µg/mL)), sendo

que *G. sesquipedale* demonstrou a menor atividade de inibição da peroxidação lipídica entre todos os extratos testados em que as amostras eram macroalgas castanhas (CE_{50} : $75,36 \pm 3,6$ $\mu\text{g/mL}$). A capacidade quelante de íons ferrosos de extratos de algas marinhas exibiu atividade variável. O extrato etanólico de todas as algas marinhas exibiu melhor capacidade quelante de metais de íons ferrosos do que os padrões de quercetina (CE_{50} : $250,1 \pm 0,07$ $\mu\text{g/mL}$), sendo a *G. sesquipedale* a terceira macroalga a apresentar melhor capacidade (CE_{50} : $83,73 \pm ,9$ $\mu\text{g/mL}$) em comparação com as demais. Os autores (137) concluíram que a macroalga que apresentou melhores valores em todos os ensaios realizados pode ser uma fonte promissora de antioxidantes a ser usados em cosmecêuticos, não sendo neste caso a macroalga vermelha *G. sesquipedale*. No entanto e segundo os mesmos autores, são necessários mais estudos de bioatividade e constituintes isolados. Brunt e Burgess (113) no artigo de revisão compilaram as atividades biológicas de moléculas marinhas que se mostram promissoras no tratamento de problemas da pele, incluindo danos provocados por UV e envelhecimento. Os MAAs tais como micosporina-glicina:valina presente em *Porphyra tenera* apresenta atividade antioxidante pois inibe a peroxidação lipídica e elimina radicais, enquanto que porphyra-334, shionina e palitina presentes em *Porphyra umbilicalis* apresentam atividade antioxidante atuando na fotoproteção e contra o anti-envelhecimento. Noutro artigo de revisão, os autores (115) compilaram as aplicações de moléculas bioativas derivadas de algas marinhas como um potencial substituto para as suas aplicações atuais na indústria cosmética. As atividades biológicas de polissacáridos, proteínas, compostos fenólicos e pigmentos foram compiladas, comparadas chegando os autores à conclusão que estes compostos podiam ser considerados como fontes seguras de ingredientes para o consumidor e a indústria cosmética. Primeiramente, começaram por relatar que os polissacáridos sulfatados das algas vermelhas parecem ser excelentes candidatos na substituição do ácido hialurónico como um biolubrificante e antioxidante. Destacaram também o fucoidano por ser um dos polissacáridos sulfatados com utilidade particularmente na proteção da pele, antioxidantes, antienvhecimento, entre outras atividades. Desta forma, os polissacáridos sulfatados seriam atraentes nas atividades cosmecêuticas. Nesta revisão foram mencionadas as seguintes macroalgas marinhas contendo polissacáridos que apresentam atividade antioxidante: *Neoporphyra haitanensis* (anteriormente *Porphyra haitanensis*) e *Porphyra umbilicalis*.

A mesma revisão também menciona o papel importante dos aminoácidos que são aplicados nas preparações cosmecêuticas como uma parte funcional, pois apresentam várias atividades, entre elas, a atividade antioxidante (115). Os MAAs são outros compostos que desempenham um papel importante na proteção contra danos causados pela luz solar, pois agem

como moléculas antioxidantes que eliminam os radicais tóxicos de oxigénio e protegem a pele contra danos induzidos por UV. Os aminoácidos com atividade antioxidante compilados pelos autores (115) derivavam das seguintes macroalgas: *Porphyra umbilicalis*, *Neopyropia yezoensis* (anteriormente *Porphyra yezoensis*), *Acanthophora nayadiformis* e *Palmaria palmate*.

Na compilação que fizeram, os autores (115) referiram também que as macroalgas marinhas são ricas em vários compostos fenólicos. A catequina e alguns outros fitocompostos, como flavonóides, polifenóis e carotenoides mostraram eliminação de ERO, regulação negativa da via da PQAM, inibição de MMP e a elevação da produção de colagénio, dando-lhes uma aplicação mais ampla em cosméticos.

Os autores (115) fizeram mesmo uma compilação exaustiva sobre os grupos de compostos fenólicos presentes nas macroalgas vermelhas e que apresentaram atividade antioxidante:

compostos fenólicos totais: *Polysiphonia morrowii*

- compostos fenólicos: *Agarophyton vermiculophyllum* (antigamente *Gracilaria vermiculophylla*), *Ceramium rubrum*, *Pyropia columbina* (antigamente *Porphyra columbina*)
- compostos fenólicos e flavonoides: *Vertebrata thuyoides* (formerly *Boergeseniella thuyoides*), *Gracilaria multipartita*
- flavonoides: *Gelidium elegans*,
- flavonoides e polifenóis: *Laurencia chilensis*, *Chondracanthus chamissoi*

No estudo desenvolvido por alguns autores (146) avaliou-se o potencial biotecnológico de 26 espécies de macroalgas marinhas (oito Rhodophyta) das lagoas de ilhas vulcânicas da Polinésia Francesa, ou seja, Taiti, Moorea e Tubuai. O CFT foi determinado através do ensaio FC e as atividades antioxidantes foram avaliadas através do ensaio DPPH, FRAC e ORAC. O CFT variou significativamente dependendo das espécies e frações. O nível mais alto de CFT por extrato foi encontrado em extratos de *Amansia rhodantha* para macroalgas vermelhas ($44,01 \pm 4,06$ mg/g EAG p.s. extrato).

As atividades de eliminação do radical DPPH das frações foram baixas em comparação com a CE₅₀ dos controles positivos. No entanto, as seguintes espécies apresentaram uma elevada percentagem de inibição de DPPH próximo ao do BHA (>80%): duas macroalgas vermelhas *A. rhodantha* e *Acanthophora spicifera* (97,9% e 84,5% respetivamente. Relativamente à atividade de eliminação, os valores de CE₅₀ dos controles positivos foram de

0,0031 mg/mL para o BHA e de 0,0057 mg/mL para o ácido ascórbico, já o CE₅₀ mais baixo foi encontrado em extratos de *A. rhodantha* (0,32 mg/mL) (146). A fração metanólica de *A. rhodantha* mostrou também a maior atividade antioxidante com o ensaio FRAP e ensaios ORAC (21,62 mg EAA/g p.s. e $0,63 \pm 0,04$ μ mol ET/mg, respetivamente) (146). No ensaio FRAP, as amostras apresentaram atividade antioxidante considerável na macroalga vermelha *G. acerosa* (17,49 mg EAA/g p.s.). Este estudo destacou um potencial antirradical ou antioxidante marcante de quatro macroalgas vermelhas (*A. spicifera*, *A. rhodantha*, *A. taxiformis* e *G. acerosa*). Contudo, a macroalga vermelha *Amansia rhodantha* exibiu as atividades antioxidantes mais fortes usando as quatro metodologias (teor fenólico total, DPPH, FRAP e ORAC), pelo que esta espécie é uma boa candidata para aplicações em medicina e indústria cosmeceútica, segundo os autores (146).

Eucheuma cottonii é uma das algas vermelhas recolhidas principalmente no Bornéu do Norte da Malásia, em Sabah. O seu principal componente é a carragenina, um polissacárido sulfatado linear biodegradável e solúvel em água com uma estrutura alternada que consiste em D-galactose-4-sulfato e 3,6-anidro-D-galactose que está ligada por uma ligação glicosídica α -1,3 e β -1,4. Xian *et al.* (129) realizou uma pesquisa com o objetivo de determinar as propriedades cosmeceúticas tais como efeitos antioxidantes nos extratos aquosos de *E. cottonii* usando métodos *in vitro*. A avaliação da atividade antioxidante do extrato de algas marinhas foi realizada através do ensaio DPPH. O rendimento da extração foi de 28,21%. A triagem fitoquímica preliminar do extrato aquoso revelou certos compostos bioativos, tais como hidratos de carbono, glicosídeos, compostos fenólicos e flavonoides.

O método DPPH foi utilizado para determinar a atividade antioxidante dos extratos que contêm compostos bioativos. Os extratos aquosos de *E. cottonii* apresentaram atividade antioxidante em várias concentrações (50, 100, 150, 200, 250, 500, 1000 e 2000 μ g/mL) (129). Neste teste, o extrato aquoso de *E. cottonii* reduziu o radical DPPH estável, contudo, de uma forma menos forte quando comparada com os controlos positivos. O valor de CE₅₀ para o ácido ascórbico foi de 0,09 mg/ml enquanto para o extrato aquoso foi de 1,99 mg/ml. Com base nestes valores, conclui-se que o extrato tem uma atividade antioxidante mais baixa do que o ácido ascórbico. Os autores desta investigação concluíram que a alga vermelha *E. cottonii* contém compostos fenólicos e polissacáridos que contribuem para a atividade antioxidante (129). Na investigação levada a cabo por Santos *et al.* (150), *Bifurcaria bifurcata* foi a macroalga escolhida para ser avaliada o seu potencial antioxidante. A atividade antioxidante do extrato diclorometano de *B. bifurcata* foi avaliada pelos ensaios DPPH e ABTS *in vitro*. Os resultados obtidos foram expressos como a quantidade de extrato necessária para diminuir as

concentrações de DPPH^{*} e ABTS⁺⁺ em 50% (CE₅₀), bem como em mg de ácido ascórbico e ET por g de peso seco. Os valores de CE₅₀ para ácido ascórbico e BHT (para ensaio DPPH) e para Trolox (para ensaio ABTS) também foram estimados para fins comparativos. O extrato lipofílico de *B. bifurcata* apresentou atividade antioxidante contra ambos os radicais, embora tenha sido observada maior atividade contra ABTS⁺⁺ (CE₅₀ = 116,25 ± 2,54 µg/mL) representando 23,10 ± 0,51 mg/g de equivalentes de ET p.s.

Os autores (150) concluíram que os extratos lipofílicos de *B. bifurcata* apresentaram valores de CE₅₀ contra ambos os radicais significativamente mais baixos do que aqueles determinados para ácido ascórbico ou Trolox.

Palmaria palmata (Figura 9.7) é uma alga vermelha distribuída principalmente nas áreas costeiras de alta latitude, como Irlanda e Canadá Atlântico, mas também cresce em Hokkaido, Japão. Num estudo, os autores (131) utilizaram *Palmaria palmata* proveniente de Usujiri (Hokkaido, Japão) para avaliar os efeitos do pH sobre a capacidade antioxidante dos MAAs através dos ensaios de eliminação de radicais ABTS. Foram identificados seis MAAs principais por análises de HPLC, nomeadamente, shinorina, palitina, asterina-330, porfira-334, usujirene e palitina. Sendo a palitina e porfira-334 os principais componentes de *P. palmata*. A capacidade antioxidante é uma das principais funções dos MAAs, contudo o efeito do pH nos MAAs não está bem conhecido, de acordo com os mesmos autores (132). A avaliação da dependência do pH na atividade de eliminação de ABTS foi determinada usando extratos brutos de MAAs, palitina e porfira-334.

No ensaio ABTS, os valores de CE₅₀ de extrato bruto de MAAs de *P. palmata* foram variando consoante o pH 5,8 (CE₅₀= 0,36 mg/mL), pH 6,6 (CE₅₀= 0,33 mg/mL), pH 7,4 (CE₅₀= 0,28 mg/mL) e pH 8,0 (CE₅₀= 0,14 mg/mL) pelo que a capacidade antioxidante foi maior em condição alcalina. Palitina (CE₅₀ = 12,0 µM) e porfira-334 (CE₅₀ = 20,8 µM) também apresentaram maior atividade eliminadora do radical ABTS em meio alcalino (pH 8,0). O valor CE₅₀ do ácido ascórbico, que foi usado como padrão, foi de 8,9 µM a pH 8,0, indicando que a palitina e a porfira-334 apresentam um grande potencial como antioxidantes em algas vermelhas.

Os autores (131) concluíram que MAAs bruto, palitina e porfira-334 revelaram maior atividade de eliminação em meio alcalino num ensaio de reação ET, o que sugere que o pH deve ser considerado ao usar MAAs como componentes antioxidantes em produtos de biotecnologia.



Figura 9.7 – *Palmaria palmata*. (Retirado de (134)).

Hentati *et al.* (145) mencionam no seu artigo de revisão que as carrageninas isoladas de *Spyridia hypnoides* possuem grandes propriedades antioxidantes relacionadas ao conteúdo de sulfato. Além disso, também destacam o efeito antioxidante de carrageninas extraídas de *Mastocarpus stellatus*, *Gracilaria caudata*, *Gracilaria birdiae* e *Porphyra haitanensis* e fazem referência a um estudo que avaliou as atividades antioxidantes *in vitro* de ι -carrageninas (*Eucheuma spinosum*), κ -carrageninas (*Eucheuma cottonii*) e λ -carrageninas (*Gigartina acicularis* e *G. pistillata*), sendo a λ -carragenina a carragenina que demonstrou o melhor potencial antioxidante em comparação com κ - e ι -carragena. Os autores aludem à utilização de polissacáridos de algas, especialmente os polissacáridos sulfatados, como sendo uma fonte natural de antioxidantes e interessantes para aplicações na indústria cosmética.

A composição química e propriedades antioxidantes do extrato obtido da alga vermelha *Laurencia caspica* recolhida na costa do Pacífico sul do Mar Cáspio foi avaliada no estudo realizado por Moshfegh *et al.* (151). A capacidade antioxidante e o conteúdo fenólico total do extrato de algas foram avaliados através do ensaio de eliminação DPPH e de Folin-Ciocalteu, respetivamente.

No ensaio DPPH, a vitamina C foi usada como controlo positivo. O extrato de *L. caspica* apresentou potente propriedade antioxidante com aumento na concentração do extrato, quando comparado à vitamina C como controle positivo. A maior percentagem de inibição calculada em *L. caspica* foi de 65,79%, que foi inferior à da vitamina C a 2 mg/mL (93,26%). Apesar da atividade antioxidante do extrato de *L. caspica* ter sido demonstrada, os autores recomendam que sejam realizadas pesquisas subseqüentes sobre a importância farmacêutica e na cosmética de *L. caspica*. O CFT dos extratos de algas foi de 0,0128 mg EAG/g. Neste estudo, os autores referem que geralmente a propriedade antioxidante do género *Laurencia* se baseava no valor do seu CFT. Diferentes estudos demonstraram uma correlação positiva entre alta

atividade antioxidante e conteúdo fenólico total, e muitos pesquisadores indicaram que os compostos fenólicos são uma das capacidades antioxidantes mais eficientes em algas marinhas.

10. Conclusão

Relativamente aos diferentes filios de macroalgas que existem, as macroalgas castanhas são as que apresentam mais estudos realizados para avaliar a atividade antioxidante, seguido pelas macroalgas vermelhas e, por último, as macroalgas verdes. Tal poderá ser explicado pelo facto de se saber que as macroalgas castanhas são o único filo que apresenta na sua composição química os florotaninos e maior conteúdo de compostos fenólicos.

Em todos os estudos analisados *in vitro* concluiu-se que a concentração de compostos fenólicos e a atividade antioxidante estavam muitas vezes diretamente relacionadas, isto é, quanto maior era o conteúdo fenólico, maior era a atividade antioxidante encontrada. Neste sentido, as macroalgas verdes apresentavam teores relativamente baixos de compostos fenólicos pelo que a atividade antioxidante encontrada não era elevada, não sendo, portanto, as melhores candidatas para serem utilizadas em estudos *in vivo* de atividade antioxidante.

Relativamente às macroalgas castanhas, foi possível concluir-se que as algas da ordem Fucales apresentaram atividades antioxidantes superiores às de Laminariales.

A análise de várias macroalgas dentro do mesmo filo fez com que fosse possível concluir que apesar das macroalgas pertencerem ao mesmo filo, estas apresentam diferenças significativas no seu conteúdo de compostos bioativos.

A natureza do solvente de extração também é um fator a ter em conta, pois os compostos presentes nas macroalgas podem ser hidrofílicos, semipolares ou lipofílicos. A realização de vários estudos utilizando diferentes solventes de extração fez com que fosse possível detetar qual o solvente mais adequado para a extração de todas as classes ou de uma classe específica de compostos e também obter informações relativamente à polaridade dos compostos presentes nas macroalgas.

Por fim, as macroalgas podem ser consideradas uma fonte interessante e promissora para a obtenção de novas matérias-primas para a formulação de produtos cosméticos inovadores. Contudo, apesar da vasta diversidade de macroalgas que apresentam compostos com atividade antioxidante *in vitro* e que podem ser utilizados em cosmeceúticos, é necessário a realização de estudos *in vivo*.

11. Referências Bibliográficas

1. Mitsui T. *New Cosmetic Science*. Amsterdam Elsevier Sci BV,. 1997;342–5.
2. Kligman D. Cosmeceuticals. *Dermatol Clin* [Internet]. 2000 Oct 1 [cited 2021 Mar 17];18(4):609–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11059368>
3. Farris PK. *Cosmeceuticals and cosmetic Practice*. Wiley-blackwell; 2013. 295 p.
4. Alves A, Sousa E, Sousa E, Kijjoa A, Kijjoa A, Pinto M, et al. Marine-derived compounds with potential use as cosmeceuticals and nutricosmetics. *Molecules*. 2020;25(11).
5. Cosmetics Europe - the personal care association: cosmetics industry [Internet]. [cited 2021 Jul 2]. Available from: <https://cosmeticseurope.eu/cosmetics-industry/>
6. Kim S-K. *Marine cosmeceuticals: trends and prospects*. Taylor & Francis Group; 2011. 390 p.
7. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur J Med Chem*. 2015 Apr 21;97:55–74.
8. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra N. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010 Jul;4(8):118–26.
9. Hunyadi A. The mechanism(s) of action of antioxidants: from scavenging reactive oxygen/nitrogen species to redox signaling and the generation of bioactive secondary metabolites. *Med Res Rev*. 2019 Nov 1;39(6):2505–33.
10. HARMAN D. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*. 1956;11(3):298–300.
11. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000 Nov 9;408(6809):239–47.
12. Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1147:37–52.
13. Dhalla NS, Temsah RM, Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 2000;18(6):655–73.
14. Sundaram Sanjay S, Shukla AK. Mechanism of antioxidant activity. *Potential Ther Appl Nanoantioxidants* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 6];83–99. Available from: https://link.springer.com/10.1007/978-981-16-1143-8_4
15. Jaganjac M, Cindrić M, Jakovčević A, Žarković K, Žarković N. Lipid peroxidation in brain tumors. *Neurochem Int*. 2021 Oct 1;149.
16. Pudlarz AM, Czechowska E, S Karbownik M, Ranoszek-Soliwoda K, Tomaszewska E, Celichowski G, et al. The effect of immobilized antioxidant enzymes on the oxidative stress in UV-irradiated rat skin. *Nanomedicine*. 2020;15(1):23–39.
17. Aguirre-Cruz G, León-López A, Cruz-Gómez V, Jiménez-Alvarado R, Aguirre-Álvarez G. Collagen hydrolysates for skin protection: oral administration and topical formulation. *Antioxidants*. 2020 Feb 1;9(2).

18. Pisoschi AM, Pop A, Iordache F, Stanca L, Predoi G, Serban AI. Oxidative stress mitigation by antioxidants - An overview on their chemistry and influences on health status. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2021;209:112891. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112891>
19. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants maintain cellular redox homeostasis by elimination of reactive oxygen species. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(2):532–53.
20. Mirończuk-Chodakowska I, Witkowska AM, Zujko ME. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. *Adv Med Sci*. 2018;63(1):68–78.
21. Azat Aziz M, Shehab Diab A, Abdulrazak Mohammed A. Antioxidant categories and mode of action. *Antioxidants*. 2019 Nov 6;
22. Mustacich D, Powis G. Thioredoxin reductase. *Biochem J*. 2000;346:1–8.
23. Hendgen-Cotta UB, Kelm M, Rassaf T. Myoglobin functions in the heart. *Free Radic Biol Med*. 2014;73:252–9.
24. Vincent JL, Russell JA, Jacob M, Martin G, Guidet B, Wernerman J, et al. Albumin administration in the acutely ill: What is new and where next? *Crit Care*. 2014 Jul 16;18(4).
25. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. 2008 Jun 11;582(13):1783–7.
26. De Barcelos IP, Haas RH. Coq10 and aging. *Biology (Basel)*. 2019;8(2):1–22.
27. Gutierrez-Mariscal FM, Yubero-Serrano EM, Villalba JM, Lopez-Miranda J. Coenzyme Q10: from bench to clinic in aging diseases, a translational review. *Crit Rev Food Sci Nutr* [Internet]. 2019 Aug 6 [cited 2021 Oct 23];59(14):2240–57. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=bfsn20>
28. Galano A, Castañeda-Arriaga R, Pérez-González A, Tan DX, Reiter RJ. Phenolic melatonin-related compounds: their role as chemical protectors against oxidative stress. *Molecules*. 2016;21(11).
29. Hacısevki A, Baba B. An overview of melatonin as an antioxidant molecule: A biochemical approach. *Melatonin - Mol Biol Clin Pharm Approaches*. 2018 Nov 21;
30. Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Rosales-Corral SA. Melatonin and stable circadian rhythms optimize maternal, placental and fetal physiology. *Hum Reprod Update*. 2014 Mar;20(2):293–307.
31. Reiter RJ, Mayo JC, Tan DX, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L. Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res*. 2016;(June):253–78.
32. Maruhashi T, Kihara Y, Higashi Y. Bilirubin and endothelial function. *J Atheroscler Thromb*. 2019;26(8):688–96.
33. Minois N, Carmona-Gutierrez D, Madeo F. Polyamines in aging and disease. *Aging (Albany NY)*. 2011;3(8):716–32.
34. Fujisawa S, Kadoma Y. Kinetic evaluation of polyamines as radical scavengers. *Anticancer Res*. 2005;25(2 A):965–9.

35. Caritá AC, Fonseca-Santos B, Shultz JD, Michniak-Kohn B, Chorilli M, Leonardi GR. Vitamin C: one compound, several uses. Advances for delivery, efficiency and stability. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med.* 2020 Feb 1;24.
36. Pehlivan FE. Vitamin C: An Antioxidant Agent. *Vitam C.* 2017 Aug 2;13.
37. Blaner WS, Shmarakov IO, Traber MG. Vitamin A and vitamin E: will the real antioxidant please stand up? *Annu Rev Nutr* [Internet]. 2021 Sep 20 [cited 2021 Sep 14];41(1). Available from: <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-082018->
38. María Molina Trinidad E, Antonio Becerril Flores M, Luis Imbert Palafox J, Vargas Servín L. Importance of the nutrition with antioxidants in the treatment of cancer and others damages. *Antioxidants.* 2019 Nov 6;
39. Zinder R, Cooley R, Vlad LG, Molnar JA. Vitamin A and wound healing. *Nutr Clin Pract.* 2019;34(6):839–49.
40. Vitamin A: MedlinePlus Medical Encyclopedia [Internet]. [cited 2021 Sep 14]. Available from: <https://medlineplus.gov/ency/article/002400.htm>
41. Vitamin A | Linus Pauling Institute | Oregon State University [Internet]. [cited 2021 Sep 14]. Available from: <https://lpi.oregonstate.edu/mic/vitamins/vitamin-A>
42. Dao DQ, Ngo TC, Thong NM, Nam PC. Is Vitamin A an antioxidant or a pro-oxidant? *J Phys Chem B.* 2017 Oct 12;121(40):9348–57.
43. Aryal S, Baniya MK, Danekhu K, Kunwar P, Gurung R, Koirala N. Total Phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from western Nepal. *Plants.* 2019 Apr 1;8(4).
44. Kumar N, Goel N. Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. *Biotechnol Reports.* 2019 Dec 1;24.
45. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem.* 2002;13(10):572–84.
46. Ahn-Jarvis JH, Parihar A, Doseff AI. Dietary flavonoids for immunoregulation and cancer: Food design for targeting disease. *Antioxidants.* 2019;8(7):1–30.
47. Harsini SG, Habibiyan M, Moeini MM, Abdolmohammadi AR. Effects of dietary selenium, vitamin E, and their combination on growth, serum metabolites, and antioxidant defense system in skeletal muscle of broilers under heat stress. *Biol Trace Elem Res.* 2012;148(3):322–30.
48. Noguchi N, Watanabe A, Shi H. Diverse functions of antioxidants. *Free Radic Res* [Internet]. 2000 [cited 2021 Sep 13];33(6):809–17. Available from: <https://doi.org/10.1080/10715760000301331>
49. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med* [Internet]. 2018;54(4):287–93. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>
50. Liang N, Kitts DD. Antioxidant property of coffee components: Assessment of methods that define mechanism of action. *Molecules.* 2014 Nov 19;19(11):19180–208.
51. Mazzone G, Malaj N, Galano A, Russo N, Toscano M. Antioxidant properties of several

- coumarin-chalcone hybrids from theoretical insights. *RSC Adv.* 2015;5(1):565–75.
52. Akar Z, Küçük M, Doğan H. A new colorimetric DPPH• scavenging activity method with no need for a spectrophotometer applied on synthetic and natural antioxidants and medicinal herbs. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2017 Jan 1;32(1):640–7.
 53. Normah, Hanapi. antioxidant capacity of the green leafy vegetables using oxygen radical antioxidant capacity (orac), 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid(abts) and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (dpph) assays. 2019 [cited 2021 Sep 21]; Available from: <http://doi.org/10.26480/gws.01.2019.01.07>
 54. Al-Hmoud HA, Ibrahim NE, El-Hallous EI. Surfactants solubility, concentration and the other formulations effects on the drug release rate from a controlled-release matrix. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*; 2014;8(13):364–71. Available from: <http://www.academicjournals.org/AJPP>
 55. Munteanu IG, Apetrei C. Analytical methods used in determining antioxidant activity: A review. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 1;22(7).
 56. 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 May;26(9–10):1231–7.
 57. Shahidi F. *Handbook of antioxidants for Food.* Woodhead Publishing; 2015. 515 p.
 58. Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JLFC. Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta.* 2008 Apr 14;613(1):1–19.
 59. Ou B, Hampsch-Woodill M, Prior RL. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J Agric Food Chem.* 2001;49(10):4619–26.
 60. Berthon JY, Nachat-Kappes R, Bey M, Cadoret JP, Renimel I, Filaire E. Marine algae as attractive source to skin care. *Free Radic Res [Internet].* 2017 Jun 3 [cited 2021 Aug 16];51(6):555–67. Available from: <https://doi.org/10.1080/10715762.2017.1355550>
 61. Wang L, Lee WW, Oh JY, Cui YR, Ryu BM, Jeon YJ. Protective effect of sulfated polysaccharides from celluclast-assisted extract of hizikia fusiforme against ultraviolet B-induced skin damage by regulating NF-κB, AP-1, and MAPKs signaling pathways in vitro in human dermal fibroblasts. *Mar Drugs.* 2018 Jul 1;16(7).
 62. Catarino MD, Amarante SJ, Mateus N, Silva AMS, Cardoso SM. Brown algae phlorotannins: a marine alternative to break the oxidative stress, inflammation and cancer network. *Foods [Internet].* 2021 Jun 25 [cited 2021 Jul 18];10(7):1478. Available from: <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/7/1478>
 63. Vega J, Bonomi-Barufi J, Gómez-Pinchetti JL, Figueroa FL. Cyanobacteria and red macroalgae as potential sources of antioxidants and UV radiation-absorbing Compounds for cosmeceutical applications. *Mar Drugs.* 2020;18(12).
 64. Wang L, Je JG, Yang HW, Jeon YJ, Lee S. Dieckol, an algae-derived phenolic compound, suppresses uvb-induced skin damage in human dermal fibroblasts and its underlying mechanisms. *Antioxidants.* 2021;10(3):1–12.
 65. Rinnerthaler M, Bischof J, Streubel MK, Trost A, Richter K. Oxidative stress in aging human skin. *Biomolecules.* 2015 Apr 21;5(2):545–89.

66. Park, Jihae, Lee H, Choi S, Pandey LK, Depuydt S, De Saeger J, *et al.* Extracts of red seaweed, *Pyropia yezoensis*, inhibit melanogenesis but stimulate collagen synthesis. *J Appl Phycol.* 2021;33(1):653–62.
67. Adil MD, Kaiser P, Satti NK, Zargar AM, Vishwakarma RA, Tasduq SA. Effect of *Embllica officinalis* (fruit) against UVB-induced photo-aging in human skin fibroblasts. *J Ethnopharmacol.* 2010 Oct 28;132(1):109–14.
68. Gunn F. *The artificial face: a history of cosmetics.* 1973.
69. Graham JA. Poucher's perfumes, cosmetics and soaps. 10th ed. *Poucher's Perfumes, Cosmetics and Soaps.* 2000. 749–767 p.
70. Draelos ZD. *Cosmetics: the medicine of beauty.* Vol. 14, *Journal of Cosmetic Dermatology.* Blackwell Publishing Ltd; 2015. p. 91.
71. Houaiss, Antônio; Franco, Francisco; Villar, Mauro; Almeida, José; Cateleiro J. *Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa.* Círculo de Leitores, editor. Lisboa; 2002. 1106 p.
72. *Cosmetics Europe - The Personal Care Association: History of Cosmetics* [Internet]. [cited 2021 May 14]. Available from: <https://cosmeticseurope.eu/cosmetics-industry/history-cosmetics/>
73. Hunt KA, Fate J, Dodds B. Cultural and social influences on the perception of beauty: a case analysis of the cosmetics industry. *J Bus Case Stud.* 2011 Jan 25;7(1).
74. Blanco-Davila F. Cosmetic special topic beauty and the body : the origins of cosmetics. *Div Plast Reconstrucive Surg Univ Hosp.* 1999;105(3):1196–204.
75. *Definição de cosmética - Pesquisa Google* [Internet]. [cited 2021 May 7]. Available from: <https://www.google.com/search?q=definição+de+cosmética&oq=definição+de+cosmética&aqs=chrome.0.69i59j0i22i30j69i60.4487j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8>
76. *Cosmética | Definição ou significado de cosmética no Dicionário Infopédia da Língua Portuguesa* [Internet]. [cited 2021 May 7]. Available from: <https://www.infopedia.pt/dicionarios/lingua-portuguesa/cosmética>
77. União Europeia. *Regulmento (CE) N°1223/2009 Do Parlamento Europeu e do Conselho.* *J Of da União Eur.* 2009;151.
78. *Decreto-Lei n.º 189/2008, de 24 de Setembro* [Internet]. [cited 2021 Jun 16]. Available from: https://www.infarmed.pt/documents/15786/1076326/115-A_DL_189_2008_5Alt-A.pdf
79. *Medicamentos de uso humano - INFARMED, I.P.* [Internet]. [cited 2021 Jun 12]. Available from: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/medicamentos-uso-humano>
80. Reed RE. The definition of 'Cosmeceutical'. *J Soc Cosmet Chem.* 1962;13:103–6.
81. Newburger AE. Cosmeceuticals: myths and misconceptions. *Clin Dermatol.* 2009 Sep;27(5):446–52.
82. Kligman A. The future of cosmeceuticals: an interview with Albert Kligman, MD, PhD. Interview by Zoe Diana Draelos. *Dermatol Surg.* 2005;31(7 Pt 2):890–1.

83. Thiagarasaiyar K, Goh BH, Jeon YJ, Yow YY. Algae metabolites in cosmeceutical: An overview of current applications and challenges. Vol. 18, Marine Drugs. MDPI AG; 2020.
84. Joshi LS, Pawar HA. Herbal cosmetics and cosmeceuticals: an overview. Nat Prod Chem Res. 2015;3(2):170.
85. Draelos ZD. Cosmeceuticals efficacy and influence on skin tone. 2014 [cited 2021 May 4]; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2013.12.002>
86. União Europeia. Directiva 2001/83/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de novembro de 2001 [Internet]. Jornal Oficial das Comunidades Europeias. 2001 [cited 2021 Jun 4]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/PT/TXT/PDF/?uri=CELEX:32001L0083&qid=1622804038801&from=PT>
87. Diário da República, 1. a série-N. o 167-30 de Agosto de 2006.
88. On O, Demarcation THE, The B, Products C, Products THEM, Agreed AS, *et al.* Guidance document on the demarcation between the cosmetic products directive 76/768 and the medical products directive 2001/83 as agreed between the comission services and the competent authorities of Member States. 2015;
89. Agência Europeia de Medicamentos (EMA) | União Europeia [Internet]. [cited 2021 Jun 12]. Available from: https://europa.eu/european-union/about-eu/agencies/ema_pt#como-funciona
90. Cosméticos - INFARMED, I.P. [Internet]. [cited 2021 May 29]. Available from: <https://www.infarmed.pt/web/infarmed/perguntas-frequentes-area-transversal/cosméticos>
91. Borderline products | Internal Market, Industry, Entrepreneurship and SMEs [Internet]. [cited 2021 Jun 16]. Available from: <https://ec.europa.eu/growth/sectors/cosmetics/products/borderline-products/>
92. ‘Cosmeceutical’ | FDA [Internet]. [cited 2021 Jun 13]. Available from: <https://www.fda.gov/cosmetics/cosmetics-labeling-claims/cosmeceutical>
93. What We Do | FDA [Internet]. [cited 2021 Jun 13]. Available from: <https://www.fda.gov/about-fda/what-we-do>
94. Dureja H, Kaushik D, Gupta M, Kumar V, Lather V. Cosmeceuticals: an emerging concept. Vol. 37, Indian Journal of Pharmacology. Medknow Publications and Media Pvt. Ltd; 2005. p. 155–9.
95. Pimentel FB, Alves RC, Rodrigues F, Oliveira MBPP. Macroalgae-derived ingredients for cosmetic industry-an update. Cosmetics. 2018;5(1):4–9.
96. Wang HMD, Chen CC, Huynh P, Chang JS. Exploring the potential of using algae in cosmetics. Bioresour Technol [Internet]. 2015;184:355–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.001>
97. • Global market value for natural/organic cosmetics and personal care in 2018-2027 | Statista [Internet]. [cited 2021 Jul 2]. Available from: <https://www.statista.com/statistics/673641/global-market-value-for-natural-cosmetics/>
98. Kim SK. Marine cosmeceuticals. J Cosmet Dermatol. 2014;13(1):56–67.

99. Agrawal S, Adholeya A, Barrow CJ, Deshmukh SK. Marine fungi: An untapped bioresource for future cosmeceuticals. *Phytochem Lett.* 2018 Feb 1;23:15–20.
100. Danovaro R, Snelgrove PVR, Tyler P. Challenging the paradigms of deep-sea ecology. Vol. 29, *Trends in Ecology and Evolution.* Elsevier Ltd; 2014. p. 465–75.
101. Rotter A, Barbier M, Bertoni F, Bones AM, Cancela ML, Carlsson J, et al. The essentials of marine biotechnology. Vol. 8, *Frontiers in Marine Science.* Frontiers Media S.A.; 2021.
102. Esposito R, Ruocco N, Viel T, Federico S, Zupo V, Costantini M. Sponges and their symbionts as a source of valuable compounds in cosmeceutical field. *Mar Drugs* [Internet]. 2021 Aug 2 [cited 2021 Aug 4];19(8):444. Available from: <https://www.mdpi.com/1660-3397/19/8/444>
103. Corinaldesi C, Barone G, Marcellini F, Dell'Anno A, Danovaro R. Marine microbial-derived molecules and their potential use in cosmeceutical and cosmetic products. *Mar Drugs.* 2017;15(4):1–21.
104. Stoyneva-Gärtner M, Uzunov B, Gärtner G. Enigmatic microalgae from aeroterrestrial and extreme habitats in cosmetics: The potential of the untapped natural sources. *Cosmetics.* 2020;7(2):1–22.
105. Alves A, Sousa E, Sousa E, Kijjoa A, Kijjoa A, Pinto M, et al. Marine-derived compounds with potential use as cosmeceuticals and nutricosmetics. Vol. 25, *Molecules.* MDPI AG; 2020.
106. Siahaan EA, Pangestuti R, Munandar H, Kim SK. Cosmeceuticals properties of sea cucumbers: Prospects and trends. Vol. 4, *Cosmetics.* MDPI AG; 2017.
107. Thomas NV, Kim SK. Beneficial effects of marine algal compounds in cosmeceuticals. *Mar Drugs.* 2013;11(1):146–64.
108. Salehi B, Sharifi-Rad J, Seca AML, Pinto DCGA, Michalak I, Trincone A, et al. Current trends on seaweeds: looking at chemical composition, phytopharmacology, and cosmetic applications. *Molecules.* 2019 Nov 18;24(22).
109. Pereira L. Seaweeds as source of bioactive substances and skin care therapy- Cosmeceuticals, algotherapy, and thalassotherapy. Vol. 5, *Cosmetics.* MDPI AG; 2018.
110. Peng Q, Cai J, Long J, Yang B, Lin X, Wang J, et al. New azaphthalide and phthalide derivatives from the marine coral-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSIO41405. *Phytochem Lett.* 2021 Jun 1;43:94–7.
111. Mehbub MF, Lei J, Franco C, Zhang W. Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives. *Mar Drugs.* 2014 Aug 1;12(8):4539–77.
112. Silva S, Ferreira M, Oliveira AS, Magalhães C, Sousa ME, Pinto M, et al. Evolution of the use of antioxidants in anti-ageing cosmetics. *Int J Cosmet Sci.* 2019;41(4):378–86.
113. Brunt EG, Burgess JG. The promise of marine molecules as cosmetic active ingredients. *Int J Cosmet Sci.* 2018 Feb 1;40(1):1–15.
114. Zubia M, Robledo D, Freile-Pelegri Y. Antioxidant activities in tropical marine macroalgae from the Yucatan Peninsula, Mexico. *J Appl Phycol.* 2007 Oct;19(5):449–58.

115. Kalasariya HS, Yadav VK, Yadav KK, Tirth V, Algahtani A, Islam S, *et al.* Seaweed-based molecules and their potential biological activities: an eco-sustainable cosmetics. *Molecules* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2021 Sep 22];26(17):5313. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/17/5313>
116. Ariede MB, Candido TM, Jacome ALM, Velasco MVR, de Carvalho JCM, Baby AR. Cosmetic attributes of algae - A review. Vol. 25, *Algal Research*. Elsevier B.V.; 2017. p. 483–7.
117. EPHEMER™ - Seppic - datasheet [Internet]. [cited 2021 Sep 23]. Available from: <https://cosmetics.specialchem.com/product/i-seppic-ephemer>
118. Helioguard™ 365 - Mibelle Biochemistry - datasheet [Internet]. [cited 2021 Sep 23]. Available from: <https://cosmetics.specialchem.com/product/i-mibelle-biochemistry-helioguard-365>
119. Schmid BD, Schürch C, Züllli F. Mycosporine-like amino acids from red algae protect against Premature Skin-Aging Abstract : 2006;1–4.
120. HELIONORI® - GELYMA [Internet]. [cited 2021 Sep 24]. Available from: <http://www.gelyma.com/helionori.html>
121. Getachew AT, Jacobsen C, Holdt SL. Emerging technologies for the extraction of marine phenolics: Opportunities and challenges. *Mar Drugs*. 2020;18(8):1–22.
122. Xin Liu, Wenqiao Yuan, Ratna Sharma-Shivappa, John van Zanten. Antioxidant activity of phlorotannins from brown algae. *Int J Agric Biol Engineering* [Internet]. 2017 Oct [cited 2021 Aug 20];10(6):184–91. Available from: https://click.endnote.com/viewer?doi=10.25165%2Fijabe.v10i6.2854&token=WzI4MDYwNjAsIjEwLjI1MTY1L2lqYWJlLnYxMGk2LjI4NTQiXQ.V82TLMr7Cw8_JF8-BYqN8EZGWoc
123. Isaza Martínez JH, Torres Castañeda HG. Preparation and chromatographic analysis of phlorotannins. *J Chromatogr Sci*. 2013 Sep;51(8):825–38.
124. Pereira L. Biological and therapeutic properties of the seaweed polysaccharides. *Int Biol Rev*. 2018;2(2):1–50.
125. Jacobsen C, Sørensen AM, Holdt SL, Akoh CC, Hermund DB. Source, extraction , characterization and applications of novel antioxidants from seaweed. 2019;1–28.
126. Zargarzadeh M, Amaral AJR, Custódio CA, Mano JF. Biomedical applications of laminarin. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2020;232(July 2019):115774. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115774>
127. Palanisamy S, Vinosha M, Marudhupandi T, Rajasekar P, Prabhu NM. Isolation of fucoidan from *Sargassum polycystum* brown algae: structural characterization, *in vitro* antioxidant and anticancer activity. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2017;102:405–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.182>
128. Koh HSA, Lu J, Zhou W. Structure characterization and antioxidant activity of fucoidan isolated from *Undaria pinnatifida* grown in New Zealand. *Carbohydr Polym*. 2019 May 15;212:178–85.
129. Teo BSX, Gan RY, Abdul Aziz S, Sirirak T, Mohd Asmani MF, Yusuf E. *In vitro* evaluation of antioxidant and antibacterial activities of *Eucheuma cottonii* extract and its

- in vivo* evaluation of the wound-healing activity in mice. *J Cosmet Dermatol*. 2021;20(3):993–1001.
130. Kidgell JT, Magnusson M, de Nys R, Glasson CRK. Ulvan: A systematic review of extraction, composition and function. *Algal Res* [Internet]. 2019;39(January):101422. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101422>
 131. Nishida Y, Kumagai Y, Shunta Michiba, Hajime Yasui H. Efficient extraction and antioxidant capacity of mycosporine-like amino acids from red alga *Palmaria palmata* in Japan. 2020;1–18.
 132. Siahaan EA, Pangestuti R, Munandar H, Kim SK. Cosmeceuticals properties of sea cucumbers: prospects and trends. *Cosmetics*. 2017 Sep 1;4(3).
 133. Mekinić IG, Šimat V, Botić V, Crnjac A, Smoljo M, Soldo B, et al. Bioactive phenolic metabolites from adriatic brown algae *Dictyota dichotoma* and *Padina pavonica* (Dictyotaceae). *Foods*. 2021;10(6).
 134. Lomartire S, Cotas J, Pacheco D, Marques JC, Pereira L, Gonçalves AMM. Environmental impact on seaweed phenolic production and activity: an important step for compound exploitation. *Mar Drugs*. 2021;19(5):1–20.
 135. Gager L, Connan S, Molla M, Couteau C, Arbona JF, Coiffard L, et al. Active phlorotannins from seven brown seaweeds commercially harvested in Brittany (France) detected by 1H NMR and *in vitro* assays: temporal variation and potential valorization in cosmetic applications. *J Appl Phycol*. 2020 Aug 1;32(4):2375–86.
 136. Silva A, Rodrigues C, Garcia-oliveira P, Lourenço-lobos C, Silva SA, Garcia-perez P, et al. Screening of Bioactive Properties in Brown Algae from the Northwest Iberian Peninsula. 2021;1–14.
 137. Grina F, Ullah Z, Kaplaner E, Moujahid A, Eddoha R, Nasser B, et al. *In vitro* enzyme inhibitory properties, antioxidant activities, and phytochemical fingerprints of five Moroccan seaweeds. *South African J Bot*. 2020;128:152–60.
 138. Tenorio-Rodriguez PA, Murillo-Álvarez JI, Campa-Cordova ÁI, Angulo C. Antioxidant screening and phenolic content of ethanol extracts of selected Baja California Peninsula macroalgae. *J Food Sci Technol*. 2017 Feb 1;54(2):422–9.
 139. Shibata T, Ishimaru K, Kawaguchi S, Yoshikawa H, Hama Y. Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. *J Appl Phycol*. 2008 Oct;20(5):705–11.
 140. Rajauria G. In-vitro antioxidant properties of lipophilic antioxidant compounds from 3 brown seaweed. *Antioxidants*. 2019 Dec 1;8(12).
 141. Puspita M, Setyawidati NAR, Stiger-Pouvreau V, Vandanjon L, Widowati I, Radjasa OK, et al. Indonesian Sargassum species bioprospecting: potential applications of bioactive compounds and challenge for sustainable development. *Adv Bot Res*. 2020 Jan 1;95:113–61.
 142. García-Poza S, Leandro A, Cotas C, Cotas J, Marques JC, Pereira L, et al. The evolution road of seaweed aquaculture: cultivation technologies and the industry 4.0. Vol. 17, *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020. 1–42 p.
 143. Sarmiento-Padilla AL, Moreira S, Oliveira Rocha HA, Araújo RG, Govea-Salas M,

- Pinales-Márquez CD, et al. Circular bioeconomy in the production of fucoxanthin from aquatic biomass: extraction and bioactivities. *J Chem Technol Biotechnol*. 2021;(May).
144. Lourenço-Lopes C, Garcia-Oliveira P, Carpena M, Fraga-Corral M, Jimenez-Lopez C, Pereira AG, et al. Scientific approaches on extraction, purification and stability for the commercialization of fucoxanthin recovered from brown algae. *Foods*. 2020;9(8).
145. Hentati F, Tounsi L, Djomdi D, Pierre G, Delattre C, Ursu AV, et al. Bioactive polysaccharides from seaweeds. *Molecules*. 2020;25(14):1–29.
146. Zubia M, Thomas OP, Soulet S, Demoy-Schneider M, Saulnier D, Connan S, et al. Potential of tropical macroalgae from French Polynesia for biotechnological applications. *J Appl Phycol*. 2020 Aug 1;32(4):2343–62.
147. Srikong W, Bovornreungroj N, Mittraparthorn P. Antibacterial and antioxidant activities of differential solvent extractions from the green seaweed *Ulva intestinalis*. 2017;43:88–95.
148. Rangel KC, Villela LZ, Pereira K de C, Colepicolo P, Deboni HM, Gaspar LR. Assessment of the photoprotective potential and toxicity of Antarctic red macroalgae extracts from *Curdiea racovitzae* and *Iridaea cordata* for cosmetic use. *Algal Res*. 2020 Sep 1;50.
149. Ramdani M, Elasri O, Saidi N, Elkhiaati N, Taybi FA, Mostareh M, et al. Evaluation of antioxidant activity and total phenol content of *Gracilaria bursa-pastoris* harvested in Nador lagoon for an enhanced economic valorization. *Chem Biol Technol Agric*. 2017 Nov 7;4(1).
150. Santos SAO, Trindade SS, Oliveira CSD, Parreira P, Rosa D, Duarte MF, et al. Lipophilic fraction of cultivated *Bifurcaria bifurcata* R. Ross: Detailed composition and in vitro prospection of current challenging bioactive properties. *Mar Drugs*. 2017 Nov 1;15(11).
151. Moshfegh A, Salehzadeh A, Sadat Shandiz SA, Shafaghi M, Naeemi AS, Salehi S. Phytochemical analysis, antioxidant, anticancer and antibacterial properties of the caspian sea red macroalgae, *Laurencia caspica*. *Iran J Sci Technol Trans A Sci* [Internet]. 2019;43(1):49–56. Available from: <https://doi.org/10.1007/s40995-017-0388-5>