



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Compostos bioativos de microalgas com interesse no
tratamento da diabetes

Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana

Alexandre da Silva Gago

2016



UNIVERSIDADE DO ALGARVE
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

Compostos bioativos de microalgas com interesse no
tratamento da diabetes

Dissertação de Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana

Alexandre da Silva Gago

Orientadores: Prof^ª. Doutora Luísa Barreira

Doutora Luísa Custódio

2016

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor João Varela por ter aceitado a realização da minha tese no laboratório do grupo de investigação de Biotecnologia Marinha (MarBiotech, CCMAR);

À Doutora Luísa Custódio (MarBiotech, CCMAR) pela orientação, críticas, sugestões e pela sua pronta disponibilidade;

À Professora Doutora Luísa Barreira (MarBiotech, CCMAR) pela orientação, sobretudo na análise e interpretação de resultados;

Ao Hugo Pereira (MarBiotech, CCMAR) pelo auxílio que prestou em relação à caracterização química;

Ao Doutor Katkam (MarBiotech, CCMAR) pelo apoio na aprendizagem de técnicas cromatográficas;

À Maria João Rodrigues (MarBiotech, CCMAR) pelo auxílio que prestou em relação aos ensaios espectrofotométricos;

A todos os colegas de laboratório, incluindo Catarina Pereira, Vanessa Neves, Tamára Santos, Marta Oliveira, Peter Schulze e Ana Raposo.

Para todos os que contribuíram para a realização deste trabalho, Um muito obrigado!

COMPOSTOS BIOATIVOS DE MICROALGAS COM INTERESSE NO TRATAMENTO DA DIABETES

Mestrado em Biologia Molecular e Microbiana

Declaração de Autoria do Trabalho

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



Alexandre da Silva Gago

Direitos de cópia ou Copyright

@ **Copyright:** Alexandre da Silva Gago

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de formato 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.

ÍNDICE

ACRÓNIMOS.....	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Microalgas	1
1.2. Compostos bioativos das microalgas	1
1.3. Microalga utilizada neste trabalho	3
1.4. Diabetes – cenário atual	4
1.5. Digestão de glúcidos e enzimas envolvidas	6
1.6. Fatores de risco da diabetes	6
1.6.1. Obesidade	6
1.6.2. <i>Stress</i> oxidativo	7
1.7. Metabolismo do ferro e do cobre	9
1.8. Inibidores naturais das enzimas alfa-amilase e alfa-glucosidase	10
1.9. Objetivo geral	13
1.9.1. Objetivos específicos	13
2. MATERIAIS E MÉTODOS	14
2.1. Material biológico e preparação dos extratos	14
2.2. Determinação da atividade antidiabética <i>in vitro</i>	14
2.2.1. Determinação da atividade inibitória na enzima alfa-glucosidase	15
2.2.2. Determinação da atividade inibitória na enzima alfa-amilase	15
2.3. Determinação da atividade inibitória na enzima lipase	16
2.4. Determinação da atividade antioxidante	16
2.4.1. Atividade de captura do radical DPPH [•]	16
2.4.2. Atividade de captura do radical do NO [•]	17
2.4.3. Atividade de captura do radical ABTS ^{*+}	18
2.5. Determinação da atividade quelante de iões metálicos	18
2.5.1. Determinação da atividade quelante de ferro	18
2.5.2. Determinação da atividade quelante de cobre	19
2.6. Fracionamento dos extractos	19
2.7. Identificação e análise de pigmentos pelo HPLC	20
2.8. Identificação e análise de compostos pelo GC-MS	21
2.9. Análise estatística	21
3. RESULTADOS	22
3.1. Extração e fracionamento	22

3.2. Atividade antidiabética	23
3.2.1. Inibição enzimática das frações	23
3.2.2. Inibição da alfa-glucosidase	25
3.2.3. Inibição da alfa-amilase	26
3.2.4. IC ₅₀ da atividade antidiabética	27
3.3. Atividade antioxidante	28
3.3.1. Captura do radical DPPH [*]	28
3.3.2. Captura do radical ABTS ^{*+}	29
3.3.3. Atividade quelante para o ferro	30
3.3.4. Atividade quelante para o cobre	31
3.3.5. IC ₅₀ da atividade antioxidante	32
3.4. Determinação de pigmentos por HPLC	33
3.5. Caracterização química por GC-MS	33
4. DISCUSSÃO	35
4.1. Inibição enzimática	35
4.2. Atividade antioxidante e quelante (Fe²⁺ e Cu²⁺)	36
4.3. Caracterização química	38
5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

ACRÓNIMOS

ABTS^{•+}	Ácido 2.2'-azino-bis-(3-etilbenzotiacolina-6-sulfónico)
AGE	Produtos finais da glicosilação avançada (do inglês, <i>Advanced glycation end-products</i>)
ALA	Ácido alfa-linolénico
BHT	Butil hidroxitolueno
DHA	Ácido docosahexaenóico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DPPH[•]	1,1-difenil-2-picrihidrazilo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP	Erro padrão
EPA	Ácido eicosapentaenóico
ERO	Espécies reativas de oxigénio
FDA	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
GC-MS	Cromatografia gasosa – espectrometria de massa (do inglês, <i>Gas chromatography – mass spectrometry</i>)
GLUT4	Transportador de glucose tipo 4
HCL	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HPO₃	Ácido metafosfórico

IDF	Federação Internacional de Diabetes (do inglês, <i>International Diabetes Federation</i>)
IP	Índice de polaridade
KI	Iodeto de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (do inglês, <i>Low Density Lipoprotein</i>)
L-NAME	N ω -Nitro-L-arginina metil éster cloridrato
MSTFA	N-Metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (do inglês, <i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>)
NGP	p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo
NIST	Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês, <i>National Institute of Standards and Technology</i>)
NO\cdot	Óxido nítrico
PBS	Tampão de fosfato salino
PNP	p-nitrofenil palmitato
PTP	Tirosina fosfatase 1B (do inglês, <i>Protein-tyrosine phosphatase 1B</i>)
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados (do inglês, <i>Polyunsaturated Fatty Acids</i>)
PV	Violeta de pirocatecol
TA	Temperatura ambiente
TLC	Cromatografia em camada fina (do inglês, <i>Thin Layer Chromatography</i>)
UV	Ultravioleta

RESUMO

A diabetes é uma doença que afeta milhões de pessoas em todo o mundo e condiciona a qualidade de vida das mesmas. A diabetes tipo 2 tem merecido destaque pelo aumento da sua incidência e pelo facto de ser uma doença evitável. O tratamento atualmente resume-se a medicação específica juntamente com uma dieta bastante restritiva. As microalgas sendo conhecidas como tendo várias aplicações biotecnológicas, como a aquacultura e indústria farmacêutica, poderão ainda constituir uma fonte natural de compostos bioativos com propriedades antidiabéticas que poderão fornecer uma alternativa menos dispendiosa e com menos efeitos colaterais ao tratamento atual da diabetes tipo 2.

Este trabalho visa avaliar as atividades biológicas de extratos orgânicos e aquosos preparados a partir de biomassa seca de *Scenedesmus* sp., nomeadamente antidiabética (inibição da α -amilase e α -glucosidase), antioxidante (captação dos radicais DPPH, ABTS e NO), quelante de ferro e de cobre e de inibição da lipase. Nos ensaios foi testado o extrato de etanol e frações resultantes do fracionamento em sílica do extrato etanólico. A fração 3A apresentou a maior atividade inibitória na α -glucosidase ($IC_{50} = 0.29$ mg/mL) e α -amilase ($IC_{50} = 0.80$ mg/mL). O extrato cru de etanol revelou maior atividade antioxidante, nomeadamente na capacidade de capturar os radicais DPPH ($IC_{50} = 3.03$ mg/mL) e ABTS ($IC_{50} = 2.41$ mg/mL). Esta fração foi também a que revelou maior atividade quelante para o ferro ($IC_{50} = 1.10$ mg/mL) e para o cobre ($IC_{50} = 3.66$ mg/mL). A composição química da fração 3A foi analisada por HPLC e GC-MS tendo-se identificado 6 compostos, nomeadamente, neofitadieno, fitol, ácido α -linolénico, ácido palmítico, ácido araquidónico e ácido palmitelaidico. Os resultados mostraram que a *Scenedesmus* sp. é uma boa fonte de compostos bioativos com aplicação no tratamento da diabetes. No entanto, será ainda necessária uma melhor caracterização química da fração ativa e identificar o ou os compostos responsáveis pela atividade antidiabética.

Palavras-chave: α -amilase, diabetes, α -glucosidase, microalgas, *Scenedesmus* sp.

ABSTRACT

Diabetes is a disease that affects millions of people throughout the world and affects the quality of life of the same. Type 2 diabetes has been highlighted by its increasing incidence and in that it is a preventable disease. The treatment currently boils down to specific medication with a very restrictive diet. Microalgae have several biotechnological applications, such as aquaculture and pharmaceutical industry, and can be a natural source of bioactive compounds with anti-diabetic properties that can provide a less expensive alternative, with fewer side effects alternative to the current treatment of Type 2 Diabetes.

This study aims to assess the biological activities of an ethanolic extract prepared from dried biomass of *Scenedesmus* sp., namely anti-diabetic (inhibition of the α -amylase and α -glucosidase enzymes), antioxidant (scavenging of radicals DPPH, ABTS and NO), chelation of the redox metals iron and copper and inhibition of lipase. In the experiments the crude ethanol extract was tested and fractions resulting from silica column fractionation. Fraction 3A showed the greatest inhibitory activity against α -glucosidase ($IC_{50} = 0.29$ mg/ml) and α -amylase ($IC_{50} = 0.80$ mg/ml). The crude ethanol extract showed a higher antioxidant activity given its higher capacity to scavenge the radicals DPPH ($IC_{50} = 3.03$ mg/ml) and ABTS ($IC_{50} = 2.41$ mg/ml). However, fraction 3A presented the higher chelating activity of iron ($IC_{50} = 1.10$ mg / ml) and copper ($IC_{50} = 3.66$ mg / ml). The chemical characterization of fraction 3A by HPLC and GC-MS resulted in the identification of 6 compounds (neophytadiene, phytol, α -linolenic acid, palmitic acid, arachidonic acid and palmitelaidic acid). These results show that *Scenedesmus* sp. is a promising source of bioactive compounds with applications in the treatment of Type 2 Diabetes. However, a better characterization of the chemical composition of the active fraction should be performed and the compound or compounds responsible for the anti-diabetic activity should be identified.

Keywords: α -amylase, diabetes, α -glucosidase, microalgae, *Scenedesmus* sp.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Microalgas

A designação “microalgas” não representa valor taxonómico, referindo-se de uma forma geral aos organismos unicelulares fotossintéticos (Derner *et al*, 2006). Apresentam uma elevada biodiversidade e grande capacidade de adaptação a diversos habitats (Cardozo *et al*, 2007). A maioria das algas unicelulares apresenta uma forma de vida planctónica, vivendo em suspensão nas zonas fóticas, colonizando desde ambientes de água doce até zonas polares e lagos extremamente salinos. Também podem apresentar uma forma de vida bentónica, ficando neste caso, condicionadas a uma área menor junto às zonas costeiras devido à atenuação da luz com a profundidade (Barsanti & Gualtieri, 2006).

Estão atualmente descritas cerca de 40,000 espécies de microalgas (Barsanti & Gualtieri, 2006). Podem apresentar-se como procariotas na divisão Cyanophyta (cianobactérias) ou como eucariotas nas divisões Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta, Heterokontophyta, Cryptophyta e Dinophyta (Derner *et al*, 2006).

1.2. Compostos bioativos das microalgas

As microalgas são os mais importantes produtores primários de biomassa. Há vários aspetos que caracterizam as microalgas e que as tornam bastante atrativas a nível biotecnológico, nomeadamente uma eficiente fotossíntese aliada a requerimentos nutricionais pouco exigentes (Plaza *et al*, 2009). As microalgas apresentam aplicações em diversas áreas, tal como na aquacultura (Natrah *et al*, 2007), produção de biocombustíveis (Koberg *et al*, 2011), medicina e indústria farmacêutica (Derner *et al*, 2006). Podem ser cultivadas em ambientes controlados, onde pode ser feita a estimulação da produção de determinado tipo de compostos bioativos através da alteração das condições de crescimento. Exemplos destes compostos bioativos são os carotenóides, ácidos gordos polinsaturados, esteróis (Cardozo *et al*, 2007), compostos fenólicos (Plaza *et al*, 2009) e alcaloides (Güven *et al*, 2010). Contudo, algumas espécies de microalgas sintetizam compostos altamente tóxicos (Derner *et al*, 2006), tal como a saxitoxina que é produzida essencialmente por dinoflagelados (Daranas *et al*, 2001).

Os carotenóides são pigmentos derivados do isopreno, uma molécula de 5 carbonos, que podem ser polimerizadas enzimaticamente formando estruturas regulares de até 40 carbonos. São considerados um grupo de terpenos, cujas extremidades apresentam ciclização formando anéis β -ionona, que podem ser substituídos por grupos hidroxilo ou epóxido, levando à formação de xantofilas. O caroteno é um precursor da vitamina A, que é catalisada pela ação da enzima β -caroteno 15,15' monoxigenase. O consumo de carotenóides na alimentação está associado à redução da incidência de determinadas patologias, ao prevenir a foto-oxidação resultante dos raios UV (Cardozo *et al*, 2007). Xantofilas como a luteína e zeaxantina previnem a degeneração da mácula lútea, que é uma região da retina essencial na visualização de detalhes e na resolução da imagem (Parmeggiani *et al*, 2012). O carotenóide licopeno diminui a incidência de cancro da próstata (Cardozo *et al*, 2007).

Relativamente aos ácidos gordos destacam-se os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) que são essenciais ao normal funcionamento celular, regulando a fluidez membranar e o transporte de oxigénio e eletrões (Cardozo *et al*, 2007). Alguns PUFA são designados de ácidos gordos essenciais, tal como os ω -3 e ω -6, devido ao facto de o ser humano não os sintetizar (Raposo *et al*, 2013). Deste compostos há dois de particular interesse, o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosa-hexaenóico (DHA), ambos da família dos ω -3. O EPA trata-se de um composto de 20 carbonos e 5 ligações duplas a partir do terceiro carbono da extremidade metil (ω). A biossíntese do EPA envolve uma série de reações, tais como a formação do ácido α -linolénico e a ação enzimática de dessaturases e elongases. A nível celular, o EPA é essencial à biossíntese de hormonas importantes na regulação fisiológica e na atividade anti-inflamatória, tais como a prostaglandina, o tromboxano e o leucotrieno (Cardozo *et al*, 2007). O DHA não difere significativamente do EPA a nível estrutural, apresenta 22 carbonos e 6 ligações duplas e a sua biossíntese é mais complexa, envolve múltiplas reações enzimáticas de dessaturases e elongases no ácido α -linolénico e termina após uma reação de β -oxidação do ácido tetracosa-hexaenóico (Rustan & Drevon, 2005). O DHA está particularmente presente na membrana fosfolipídica dos neurónios, sendo este um composto essencial na prevenção da doença de Alzheimer (Swanson *et al*, 2012). Tanto o EPA como o DHA apresentam um papel preponderante na prevenção de doenças cardiovasculares e na regulação da atividade anti-inflamatória (Rustan & Drevon, 2005).

Os esteróis são um grupo de esteroides que apresentam uma estrutura de 28 a 29 carbonos; os fitoesteróis apresentam um grupo metil ou etil extra no carbono 24 (Cardozo *et al*, 2007). Estudos anteriores demonstraram que os fitoesteróis presentes em microalgas possuem propriedades hipocolesterolémicas, reduzindo os níveis de lipoproteínas de baixa

densidade (LDL) e colesterol total. Entre estes compostos encontram-se o brassicasterol, o campesterol, o sitosterol e o estigmasterol (Raposo *et al*, 2013).

Os polifenóis são compostos fenólicos associados ao metabolismo secundário das plantas que lhes conferem proteção contra a radiação UV e agentes patogénicos. Há vários grupos de polifenóis, tal como os flavonoides, os ácidos fenólicos e as lignanas. Os flavonoides são o grupo de polifenóis mais estudado havendo atualmente mais de 4000 variedades de flavonoides identificadas (Pandey & Rizvi, 2009). A sua estrutura primária consiste num grupo fenil (anel B), ligado a um benzopirano (anéis A e C) (Tadera *et al*, 2006). Estudos epidemiológicos sugerem que uma dieta rica em polifenóis previne o desenvolvimento de cancro, diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Pandey & Rizvi, 2009). Outros compostos fenólicos encontrados em microalgas, tais como o ácido benzoico e o ácido cinâmico são precursores da síntese de polifenóis. *Spongiochloris spongiosa*, *Spirulina platensis* e *Anabaena doliolum* (estas duas últimas são cianobactérias) são exemplos de microalgas que contêm este tipo de compostos (Klejdus *et al*, 2009).

Em relação aos alcaloides, estes são compostos cíclicos ou heterocíclicos que apresentam um ou mais átomos de azoto. A feniletilamina é um exemplo de alcaloide presente em microalgas. Atua como um neuromodulador e neurotransmissor no ser humano, sendo a sua deficiência associada à depressão. A tiramina é outro alcaloide encontrado em microalgas, que atua fisiologicamente como um vasoconstritor (Güven *et al*, 2010).

1.3. Microalga utilizada neste trabalho

A microalga escolhida para este estudo foi a *Scenedesmus* sp. devido à sua composição bioquímica e presença de compostos bioativos, sendo utilizada em aplicações cosméticas (Priyadarshani & Rath, 2012) e em aquacultura (Pulz & Gross, 2004).

Scenedesmus sp. (Fig. 1) - Atualmente são aceites taxonomicamente 74 espécies do género *Scenedesmus*, pertencente à divisão Chlorophyta e à classe Chlorophyceae. Encontrada em água doce, apresenta talos unicelulares ou coloniais, formados por 2 a 32 células, mais frequentemente 4 a 8 células, designadas de coenobia. A reprodução é geralmente assexuada por autoesporos, contudo, pode apresentar reprodução sexuada (Lürling, 2003). Apresenta uma composição média de 54% de proteínas, 23% de glícidos e 17% de lípidos (Garcia-Moscoso *et al*, 2015). Devido ao seu elevado teor em lípidos,

comparativamente a outras espécies, a microalga *Scenedesmus* sp. pode ser uma mais-valia na produção de biocombustível (Jena *et al*, 2012).



Figura 1. *Scenedesmus* sp. (<http://www.ohio.edu/plantbio/vislab/algaeimage/pages/Scenedesmus.html>)

1.4. Diabetes – cenário atual

A diabetes é uma desordem metabólica que se caracteriza pelos elevados níveis de glucose no plasma sanguíneo (Kim *et al*, 2014). Se não for tratada devidamente pode conduzir a complicações tais como a neuropatia diabética, retinopatia e doenças cardiovasculares (Kumar *et al*, 2011). Classifica-se de tipo 1 ou tipo 2 consoante é ou não necessário a administração de insulina (Kim *et al*, 2014). Enquanto que a diabetes tipo 1 é uma doença autoimune que resulta da destruição ou disfunção das células β do pâncreas (responsáveis pela produção e secreção de insulina), a diabetes tipo 2 é causada essencialmente pela diminuição da sensibilidade à insulina por parte dos tecidos alvo, nomeadamente o fígado, o tecido muscular e adiposo (Drong *et al*, 2012). A diabetes tipo 2 tem recebido mais atenção por se tratar de uma doença que pode ser prevenida (Kim *et al*, 2014). De acordo com a Federação Internacional de Diabetes (IDF), em 2013 a diabetes afetava 382 milhões de pessoas no mundo, sendo estimado que em 2035 esse valor possa ascender a 592 milhões (Striegel *et al*, 2015). Atualmente a diabetes tipo 2 representa mais de 90% dos casos de diabetes a nível mundial (Lakshmanasenthil *et al*, 2014). O aparecimento de diabetes tipo 2 está geralmente associado a fatores comportamentais, relacionados com o estilo de vida, tais como o sedentarismo, o excesso de peso e uma dieta desequilibrada. Um ensaio clínico realizado nos Estados Unidos envolvendo pacientes em situação de pré-diabetes demonstrou que pelo

menos 150 minutos de atividade física semanal e uma redução de 7% do peso corporal ao longo de 24 semanas reduziram a incidência de diabetes em 58% (Narayan *et al*, 2002).

A ingestão de fibras alimentares também é essencial na prevenção de diabetes tipo 2, desacatando-se dois grupos: fibras solúveis e insolúveis. O seu consumo reduz a glicemia pós-prandial após o consumo de refeições ricas em glúcidos (Weickert & Pfeiffer, 2008). Por exemplo, as macroalgas são particularmente ricas em fibras solúveis, estas fibras absorvem água, levando um aumento da viscosidade que conduz a um aumento do tempo de digestão de glúcidos e a uma lenta absorção de glucose no sangue. Devido a este facto, o consumo de macroalgas na alimentação leva a uma redução da glicémia no sangue e do colesterol (Kim *et al*, 2014). Exemplos de fibras solúveis são o β -glucano e pectina (Mello & Laaksonen 2009). Em alguns estudos, as fibras insolúveis revelam diminuir o risco de diabetes tipo 2 ao aumentar a sensibilidade à insulina (Weickert & Pfeiffer, 2008), contudo, o mecanismo responsável por este aumento de sensibilidade não é bem claro, além de que no geral, as fibras insolúveis não demonstram efeitos significativos na redução dos níveis de glucose e insulina, ao contrário do que se sucede nas fibras solúveis. Exemplos de fibras insolúveis são a celulose e a hemicelulose (Mello & Laaksonen 2009).

A diabetes tipo 2 está normalmente associada a um desequilíbrio entre a absorção da glucose no sangue e a secreção de insulina e verifica-se hiperglicemia pós-prandial. O seu tratamento envolve medicação e controlo da dieta de forma a estimular a produção de insulina, sendo que os dois tratamentos simultâneos poderão produzir um efeito sinérgico, contudo, a dieta é por norma bastante restritiva (Kim *et al*, 2014). Existem atualmente medicamentos cujo princípio ativo inibe a atividade de enzimas associadas à digestão de glúcidos, nomeadamente a α -glucosidase. Exemplos desses medicamentos são o Glucobay[®], o Glyset[®] e o Volix[®] cujos princípios ativos são respetivamente a acarbose, o miglitol e a voglibose (van de Laar, 2008). Contudo, o uso continuado destes medicamentos pode ter efeitos secundários tais como hepatotoxicidade e sintomas gastrointestinais adversos, tal como diarreia e flatulência (Lordan *et al*, 2013). Para o tratamento da diabetes tipo 2, é mais viável diminuir a absorção de glucose no sangue através da inibição da digestão e metabolismo do amido, a principal fonte de glucose na dieta humana, dispensando o controlo da secreção da insulina (Kim *et al*, 2014). As enzimas chave envolvidas na digestão do amido são a α -amilase e a α -glucosidase. Atualmente, existem medicamentos que inibem estas enzimas, contudo, apresentam efeitos colaterais resultantes do uso continuado, daí a necessidade da procura de inibidores naturais destas enzimas (Lordan *et al*, 2013). A

utilização de inibidores naturais poderá constituir uma alternativa menos dispendiosa, com menos efeitos indesejáveis e com igual ou superior poder antidiabético.

1.5. Digestão de glúcidos e enzimas envolvidas

A digestão dos glúcidos é iniciada pela ação da enzima α -amilase, que transforma polissacarídeos complexos, como o amido e o glicogénio em oligossacarídeos como a maltose. Embora outras enzimas amilolíticas estejam envolvidas na degradação do amido, a α -amilase é essencial à iniciação do processo (Lordan *et al*, 2013). As α -amilases são endoenzimas que catalisam a hidrólise das ligações $\alpha(1,4)$ -glicosídicas de polissacarídeos complexos, sendo estruturalmente constituída por 3 domínios: A, B e C, sendo A o domínio catalítico, B um domínio relevante para a especificidade do substrato entre α -amilases e C um motivo “Greek key” (Prakash & Jaiswal, 2010).

A α -glucosidase é uma exoenzima carboidrase (Kim *et al*, 2010) que realiza a hidrólise de oligossacarídeos e dissacarídeos como a maltose e sacarose em monossacarídeos assimiláveis, como a glucose (Lordan *et al*, 2013, Kim *et al*, 2014). No ser humano há 2 proteínas com atividade α -glucosidase envolvidas na digestão dos glúcidos: a maltase-glucoamilase e a sacarase-isomaltase, ambas estruturalmente constituídas por cinco domínios: um domínio N-terminal do lado do citosol, um domínio O-glicosilado, uma região transmembranar e os domínios N- e C-terminal (Lin *et al*, 2015). Tal como a α -amilase, a α -glucosidase também catalisa a hidrólise de ligações α -glicosídicas. Ambas são secretadas no intestino, mas somente a α -amilase é encontrada na saliva (Kim *et al*, 2014).

No ser humano há no total, 6 enzimas envolvidas na degradação do amido: 2 tipos de α -amilase (salivar e pancreática) e ao nível intestinal, 4 tipos de atividades catalíticas α -glucosidase relacionadas com duas proteínas multifuncionais ligadas à membrana, mais especificamente nos domínios N- e C-terminal da maltase-glucoamilase e da sacarase-isomaltase (Lin *et al*, 2015).

1.6. Fatores de risco da diabetes

1.6.1. Obesidade

A obesidade é um fator de risco associado à diabetes tipo 2, sendo que a acumulação de gordura, sobretudo visceral, é responsável pelo aumento da resistência à insulina. O

mecanismo pelo qual esta resistência é causada não é claro, mas existem hipóteses de que elevadas concentrações de ácidos gordos livres possam estar envolvidas no processo (Cnop *et al*, 2002). Vários estudos também sugerem que a disfunção das células β do pâncreas resulta da exposição prolongada a elevados níveis de glucose, de ácidos gordos livres ou da combinação de ambos (Ceriello & Motz, 2004). Uma das consequências da elevada concentração de ácidos gordos livres é que interfere com o metabolismo da glucose, já que ocorre um aumento da produção de acetil-coenzima A que leva a uma inibição da piruvato desidrogenase, resultando num aumento do citrato ao nível citoplasmático que conduz a uma inibição da enzima fosfofrutoquinase. A inibição desta enzima resulta num aumento de glucose-6-fosfato ao nível intracelular, inibindo assim a hexoquinase e a fosforilação da glucose (Bergman & Ader, 2000).

A lipase é a enzima responsável pela degradação e absorção de lípidos no organismo. Os ácidos gordos em forma de triglicerídeos são hidrolisados pela ação da enzima lipase e convertidos em ácidos gordos livres e monogliceróis, assimiláveis na corrente sanguínea. Há duas enzimas responsáveis pela digestão dos lípidos: a lipase gástrica e a lipase pancreática (Heck *et al*, 2000).

Atualmente destaca-se o Xenical[®] como medicamento para o tratamento da obesidade. Este contém como princípio ativo o orlistato, um potente inibidor enzimático das lipases gástrica e pancreática. Trata-se de um inibidor específico e irreversível que ao formar uma ligação covalente como o centro ativo de serina, inibe a atividade enzimática das lipases, diminuindo assim a absorção de lípidos. Contudo o orlistato pode manifestar alguns efeitos colaterais adversos, nomeadamente ao nível gastrointestinal (Heck *et al*, 2000).

1.6.2. Stress oxidativo

As espécies reativas de oxigénio (ERO) são um grupo de pequenas moléculas que diferem na reatividade e na função biológica. Exemplos de espécies reativas de oxigénio são o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), o radical hidroxilo (OH^\bullet), o radical anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o ácido hipocloroso ($HOCl^\bullet$), sendo responsáveis por diversas patologias, tais como cancro, diabetes e arteriosclerose (Vozlyan & Yazlovltskaya, 2014). São formadas durante a redução do oxigénio na cadeia transportadora de eletrões mitocondrial ou em reações catalisadas pela NADPH oxidase (Vozlyan & Yazlovltskaya, 2014). Também são formadas espécies reativas de azoto em condições de *stress* oxidativo tal como o peroxinitrito ($ONOO^-$) e o óxido nítrico (NO^\bullet) (Pacher *et al*, 2007).

Em condições fisiológicas normais, as ERO são responsáveis por regular funções homeostáticas tais como a sinalização celular (H_2O_2) e a imunidade inata (HOCl) (Vozlyan & Yazlovtskaya, 2014). Quando há um desequilíbrio entre os oxidantes e antioxidantes, estamos perante uma situação de *stress* oxidativo. Neste caso, ocorrem efeitos nefastos, tal como a peroxidação lipídica, inibição enzimática e danos no DNA (Hussain *et al*, 1987). Existem mecanismos de defesa a nível celular que permitem um equilíbrio fisiológico das ERO. Uma das enzimas envolvidas na regulação das ERO é a catalase, que é responsável pela redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 , sendo a sua atividade dependente de NADPH. A enzima superóxido dismutase também é relevante na atividade antioxidante já que catalisa a dismutação do radical anião superóxido em peróxido de hidrogénio e oxigénio (Ferreira & Matsubara, 1997).

Na diabetes, o *stress* oxidativo (Fig. 2) é o principal fator responsável pela resistência à insulina dos tecidos alvo (tecido muscular e adiposo), pela disfunção das células β e pela tolerância diminuída à glucose (Ceriello & Motz, 2004). As células β do pâncreas são particularmente sensíveis ao *stress* oxidativo devido ao facto de apresentarem uma baixa concentração de enzimas antioxidantes, tal como a catalase e a superóxido dismutase (Ceriello & Motz, 2004). A resistência à insulina resulta de um mecanismo de proteção em resposta ao *stress* oxidativo em que uma proteína transportadora de glucose (GLUT4) é inibida. Esta proteína transporta glucose para o meio intracelular e é regulada por um receptor da insulina. Ao ser inibida a absorção de glucose para o meio intracelular, impede-se que ocorram processos que promovam a formação de ERO, tal como a oxidação de ácidos gordos livres (Ceriello & Motz, 2004).

O *stress* oxidativo também promove o agravamento de complicações microvasculares e cardiovasculares associadas à diabetes (Giacco & Brownlee, 2010). Geralmente, ocorre uma produção excessiva do radical anião superóxido pelo endotélio dos vasos sanguíneos e do miocárdio em situações de diabetes (Giacco & Brownlee, 2010), devido a uma perda de eletrões por parte da cadeia transportadora (Vozlyan & Yazlovtskaya, 2014). Outro fator responsável pela presença anormal deste radical é a ativação das enzimas NADPH oxidase e aldose reductase que contribuem para a diminuição do NADPH, um importante cofator na atividade antioxidante e responsável pela manutenção do balanço redox das células (Vozlyan & Yazlovtskaya, 2014). O radical anião superóxido pode reagir com o óxido nítrico, formando peroxinitrito (Vozlyan & Yazlovtskaya, 2014).

A hiperglicemia resultante da diabetes leva à ativação de 5 mecanismos responsáveis pela patogénese: formação de produtos finais de glicosilação avançada (AGE); aumento da

expressão dos receptores de AGE e ativação dos seus ligandos; ativação da via do poliol; incremento da atividade da via da hexosamina e a ativação de isoformas da proteína quinase C (Giacco & Brownlee, 2010). Estes mecanismos levam a um significativo aumento intracelular das ERO, que resulta numa reduzida capacidade de resposta da angiogénese em situações de isquemia, já que não ocorre uma normal neovascularização (Giacco & Brownlee, 2010).

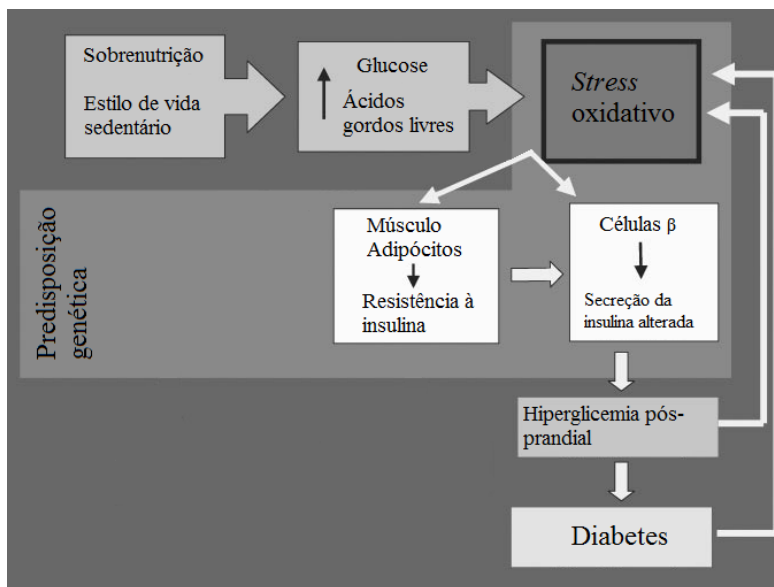


Figura 2. O stress oxidativo, resultante dos elevados níveis de glucose e de ácidos gordos livres, é responsável pela resistência à insulina e disfunção das células β . Consequentemente há menor secreção de insulina, o que leva à ocorrência de hiperglicemia pós-prandial, que também induz o *stress* oxidativo. A persistência desta condição leva à exaustão das células β e consequentemente, à ocorrência da diabetes (Ceriello & Motz, 2004).

1.7. Metabolismo do ferro e do cobre

O ferro e o cobre são nutrientes essenciais, sendo que o metabolismo de ambos se encontra intimamente ligado; uma diminuição sistémica dos níveis de cobre resulta numa deficiência dos níveis de ferro ao nível celular, podendo comprometer a função neuronal, a resposta imunitária e a mineralização dos ossos (Arredondo & Núñez, 2005). O cobre é necessário ao funcionamento de mais de 30 proteínas, entre as quais a superóxido dismutase (envolvida na atividade antioxidante), a ceruloplasmina (ferroxidase envolvida no metabolismo do ferro) e a citocromo c oxidase (presente na cadeia transportadora de eletrões). Em relação ao ferro, este é necessário ao funcionamento de algumas proteínas essenciais, tal como as proteínas hémicas (como a hemoglobina e a mioglobina), proteínas presentes na cadeia transportadora de eletrões e proteínas de ferro-enxofre (Arredondo & Núñez, 2005). O ferro e o cobre destacam-se pela capacidade de participar em reações que envolvem a troca de um único eletrão. Apresentam-se biologicamente como Fe^{3+} e Cu^{2+} na forma oxidada e como Fe^{2+} e Cu^{+} na forma reduzida (Arredondo & Núñez, 2005).

Em relação às funções fisiológicas, o ferro demonstra ser essencial à mielinização do sistema nervoso e à atividade de algumas células do sistema imunitário, como os neutrófilos, já que o ferro é necessário ao funcionamento da enzima mieloperoxidase, uma enzima abundante nos neutrófilos, produtora de espécies reativas oxigênio que atacam os agentes patogénicos (Arredondo & Núñez, 2005). O cobre também é essencial ao funcionamento do sistema imunitário já que durante o processo inflamatório, o cobre é responsável pela produção de interleucina 2, essencial à maturação dos linfócitos T. Durante a inflamação, verifica-se um aumento dos níveis de cobre no plasma sanguíneo e uma diminuição dos níveis de ferro (Arredondo & Núñez, 2005).

Relativamente á diabetes, o cobre revela ser necessário à atividade catalítica da enzima superóxido dismutase, responsável pela dismutação do radical superóxido, presente a nível micro e macrovascular em doentes com diabetes tipo 2 (Khan & Awan, 2014). No entanto, há que destacar que ferro e o cobre na sua forma reduzida (Fe^{2+} e Cu^+) catalisam a dismutação do peróxido de hidrogénio através das reações de Fenton e Haber-Weiss, levando a que formem radicais hidroxilo (Garrick *et al*, 2003). Portanto, elevados níveis de ferro e cobre podem levar a que ocorra oxidação de diversas biomoléculas (DNA, lípidos e proteínas), podendo levar a uma diminuição da secreção de insulina por parte das células β (Khan & Awan, 2014). Estudos anteriores revelam uma forte correlação entre os níveis de ferritina no organismo e a resistência à insulina na fase pré-clínica da diabetes, assim sendo, a principal proteína de reserva do ferro (ferritina) poderá ser um marcador da patologia (Khan & Awan, 2014).

1.8. Inibidores naturais das enzimas α -amilase e α -glucosidase

Uma vez que existe uma relação entre *stress* oxidativo e a ocorrência da diabetes, os compostos com propriedades antioxidantes também poderão manifestar propriedades antidiabéticas. Carotenoides, polifenóis, glutatona e α -tocoferol são alguns exemplos de compostos antioxidantes (Ferreira & Matsubara, 1997), que podem ser encontrados em plantas superiores e algas, sendo que estes compostos poderão diminuir os riscos associados ao desenvolvimento da diabetes. Contudo, apenas se poderá afirmar que estes compostos possuem propriedades antidiabéticas caso sejam inibidores de enzimas como a α -amilase e α -glucosidase.

Os inibidores não tóxicos de enzimas interferem com o seu centro ativo impedindo a ligação do substrato, sendo o processo designado de inibição competitiva. Os polifenóis, por exemplo, formam ligações de hidrogénio entre os seus grupos hidroxilo e o centro catalítico

da α -amilase (Sales *et al*, 2012). Outros inibidores naturais seguem o mesmo processo, sendo que os inibidores das enzimas envolvidas na digestão de glúcidos encontram-se amplamente distribuídos em plantas superiores (Lakshmanasenthil *et al*, 2014). Também as algas são conhecidas por possuir compostos inibidores de enzimas como a α -glucosidase e a tirosina fosfatase 1B (PTP 1B) (Kim *et al*, 2010), que é um regulador negativo da via de sinalização da insulina (DaYong *et al*, 2008).

Estudos sobre as propriedades antidiabéticas de compostos bioativos envolvem maioritariamente plantas superiores e macroalgas, sendo as microalgas organismos pouco explorados ao nível das atividades biológicas. De estudos anteriores com microalgas relativos a propriedades antidiabéticas destacam-se apenas as cianobactérias (procariotas) como por exemplo a *Spirulina* em ensaios *in vivo* (Layam & Reddy, 2006). De microalgas eucariotas conhece-se essencialmente a sua composição bioquímica, pelo que, apesar de se encontrar compostos semelhantes aos encontrados em macroalgas e plantas superiores, pouco ou nada se sabe acerca das potenciais bioatividades que as microalgas possam apresentar. Devido ao aumento do número de casos de diabetes, há uma necessidade crescente na procura de biocompostos que possam constituir uma alternativa aos tratamentos convencionais, sendo as microalgas uma potencial fonte já que possuem biocompostos com atividades antioxidante e antidiabética conhecidas.

Até ao momento foram encontradas propriedades antidiabéticas em cerca de 800 espécies de plantas (Sales *et al*, 2012). Em ensaios anteriores realizados com a α -amilase, extratos de hexano, acetato de etilo e de metanol provenientes de sementes da espécie *Amaranthus caudatus* demonstraram uma capacidade inibitória acima de 80% a concentrações entre 0.25 a 1 mg/mL (Sales *et al*, 2012). Ensaios realizados com extratos provenientes de flor da espécie *Punica granatum* revelaram um potente efeito inibidor na enzima α -glucosidase, com valores próximos de 100% a concentrações muito baixas (8 e 16 μ g/mL) (Li *et al*, 2005). Também são encontradas propriedades antidiabéticas em extratos de macroalgas, por exemplo na *Ecklonia cava*, uma espécie de alga castanha, em que extratos de metanol da mesma apresentaram 50% de inibição na enzima α -glucosidase a uma concentração de 37.07 μ g/mL (Lee *et al*, 2009). Porém, um estudo mais aprofundado requer uma caracterização química dos extratos, para que se possam identificar e isolar compostos bioativos que possam ser testados nos ensaios de inibição enzimática e assim, identificar quais os compostos com maior potencial antidiabético. Ao identificar um composto puro, poderá obter-se um potencial antidiabético maior do que aquele somente obtido com o extrato e, além

disso, evitar substâncias tóxicas ou menos benéficas que possam eventualmente estar presentes nos extratos.

Vários grupos de compostos bioativos encontrados em plantas superiores (Tabela 1), como os esteroides, terpenos, flavonoides (polifenóis) e alcaloides têm demonstrado propriedades antidiabéticas (Perez *et al*, 1998).

Tabela 1. Exemplos de compostos bioativos com potencial antidiabético encontrados em plantas superiores.

Espécies	Compostos	Enzimas inibidas	Autores
<i>Adhatoda vasica</i> Nees (Acanthaceae), <i>Piper umbellatum</i> (Piperaceae)	Alcaloides	α -glucosidase	Kumar <i>et al</i> , 2011
<i>Fagara tessmannii</i> (Rutaceae), <i>Gypsophila oldhamiana</i> (Caryophyllaceae)	Terpenos	α -glucosidase	Kumar <i>et al</i> , 2011
<i>Varthemia iphionoides</i> (Asteraceae), <i>Salix gracilistyla</i> (Salicaceae)	Flavonoides	α -amilase	Al-Dabbas <i>et al</i> , 2006 Kim, 2000

Contudo, estas não se limitam às plantas superiores, sendo que também já foram isolados compostos provenientes de macroalgas com potencial antidiabético (Tabela 2), como os florotaninos (polifenóis) (Lee *et al*, 2009) e os fucoidanos nas algas castanhas (Kim *et al*, 2014) e os bromofenóis nas algas vermelhas (Kim *et al*, 2010). Os fucoidanos são compostos polissacarídeos sulfatados, constituídos por fucose e sulfatos com pequenas quantidades de galactose, xilose, manose e ácido urónico (Lakshmanasenthil *et al*, 2014).

Tabela 2. Exemplos de compostos bioativos com potencial antidiabético encontrados em macroalgas.

Espécies	Compostos	Enzimas inibidas	Autores
<i>Ecklonia cava</i> , <i>Ishige okamurae</i> (<i>Phaeophytas</i>)	Florotaninos	α -glucosidase e α -amilase	Lee <i>et al</i> , 2009 Heo <i>et al</i> , 2009
<i>Polyopes lancifolia</i> (<i>Rhodophyta</i>)	Bromofenóis	α -glucosidase	Kim <i>et al</i> , 2010
<i>Turbinaria ornata</i> , <i>Fucus vesiculosus</i> e <i>Ascophyllum nodosum</i> (<i>Phaeophytas</i>)	Fucoidanos	α -amilase (a) α -glucosidase e α -amilase (a)	Lakshmanasenthil <i>et al</i> , 2014 Kim <i>et al</i> , 2014

(a) – No ensaio com a *Turbinaria ornata* testou-se apenas a atividade inibitória na enzima α -amilase, enquanto que no ensaio com as algas *Fucus vesiculosus* e *Ascophyllum nodosum* testou-se ambas as enzimas (α -glucosidase e α -amilase).

1.9. Objetivo geral

Este trabalho tem como principal objetivo avaliar as bioatividades antioxidante e antidiabética *in vitro* de extratos orgânicos preparados a partir de biomassa seca da microalga *Scenedesmus* sp., através de métodos espectrofotométricos.

1.9.1. Objetivos específicos

1. Testar a capacidade inibitória de extratos da espécie *Scenedesmus* sp. na enzima alfa-glucosidase;
2. Fracionamento de extrato mais ativo para isolamento do composto bioativo;
3. Aprofundar a avaliação da capacidade antidiabética das frações obtidas através da determinação de:
 - a. Inibição das enzimas α -amilase e α -glucosidase de mamífero;
 - b. Inibição da enzima lipase;
 - c. Capacidade antioxidante usando métodos complementares (atividade de captura dos radicais DPPH \cdot , NO \cdot e ABTS $^{*+}$);
 - d. Atividade quelante dos íons metálicos Fe $^{2+}$ e Cu $^{2+}$;
4. Caracterização química da fração ou frações de interesse.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material biológico e preparação dos extratos

A microalga utilizada neste trabalho foi a *Scenedesmus sp.*, tendo sido fornecida pela empresa NECTON S.A sob a forma de pasta congelada.

Foi realizada uma extração simples dos compostos bioativos. Para tal foi misturada 1 g de biomassa liofilizada e congelada com 40 mL de etanol (IP=5.2) (Tabela 3) e homogeneizada com um homogeneizador IKA Ultra Turrax (2 ciclos de 1 min cada), à temperatura ambiente (TA), num balão Erlenmeyer. A extração foi feita sob agitação, durante 16h à TA e repetida três vezes. Os extratos foram combinados, filtrados com papel de filtro Whatman nº 4 e concentrados num evaporador rotativo sob pressão reduzida. O extrato seco foi pesado, ressuspenso no solvente da extração e armazenado a -20°C até posterior uso.

Tabela 3. Índice de polaridade (IP) dos solventes utilizados.

Solvente	IP
Hexano	0.1
Diclorometano	3.1
Clorofórmio	4.1
Acetato de etilo	4.4
Acetona	5.1
Metanol	5.1
Etanol	5.2
Dimetilsulfóxido (DMSO)	7.2
Água	10.2

(<http://macro.lsu.edu/howto/solvents/polarity%20index.htm>)

(<http://www.chemical-ecology.net/java/solvents.htm>)

2.2. Determinação da atividade antidiabética *in vitro*

Para a determinação da atividade antidiabética *in vitro* dos extratos foi feito o estudo da atividade inibitória em duas enzimas: alfa-glucosidase (de levedura e de mamífero) e alfa-amilase.

2.2.1. Determinação da atividade inibitória na enzima alfa-glucosidase

A atividade inibitória da α -glucosidase foi determinada de acordo com o método descrito por Kwon *et al.* (2007). Para tal, foram misturados 50 μ L de extratos em diferentes concentrações (1 a 10 mg/mL) com 100 μ L de enzima (1.0 U/mL em tampão fosfato de sódio a 0.1M e pH=7.0) e incubados durante 10 minutos, a 25°C. Posteriormente, foram adicionados 50 μ L de p-nitrofenil-a-D-glucopiranosido (NGP; 5 mM) e as amostras foram incubadas durante 5 minutos a 25°C. A absorvância foi lida a 405 nm num leitor de microplacas (Biotek Synergy 4). Como controlo positivo foi utilizada a acarbose (1 a 10 mg/mL). A acarbose é o princípio ativo do Glucobay[®], um dos medicamentos utilizados para o tratamento da diabetes. Foi também realizado um controlo de cor nas amostras com os extratos, em que a absorvância real seria o resultado da diferença entre a absorvância obtida e a absorvância do controlo da cor. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição (% I) relativamente ao controlo contendo o respetivo solvente, calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$(1) \% I = [(A_A - A_B) / A_A] \times 100\%$$

onde A_A = absorvância do controlo negativo, A_B = absorvância amostra de teste.

A inibição enzimática corresponde a uma diminuição da absorvância.

2.2.2. Determinação da atividade inibitória na enzima alfa-amilase

A atividade inibitória da α -amilase foi determinada pelo método descrito por Xiao *et al.* (2006), em extractos nas concentrações de 1 até 10 mg/mL. Foram misturados 40 μ L de extrato com 40 μ L de solução de amilase (100 U/mL em tampão de fosfato de sódio a 0.1M e pH=7.0) e com 40 μ L de solução de amido (0.1% em tampão de fosfato de sódio a 0.1M e pH=7.0). Após 10 minutos de incubação a uma temperatura de 37°C, foram adicionados 20 μ L de HCL (1M) e 100 μ L de solução de iodeto (5 mM I_2 + 5 mM KI, em água destilada (dH_2O)) e foi medida a absorvância a 580 nm. O controlo positivo utilizado nesta experiência foi a acarbose. Foi realizado o controlo de cor nas amostras com os extratos. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição (% I) calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$(2) \% I = 100 - [(A_A - A_B) / A_A] \times 100\%$$

onde A_A = absorvância do controlo negativo, A_B = absorvância amostra de teste.

A inibição enzimática corresponde a um aumento da absorvância.

2.3. Determinação da atividade inibitória na enzima lipase

A lipase é uma enzima que não está diretamente relacionada com a diabetes, sendo responsável pela degradação e absorção de lípidos no organismo. Porém, devido ao facto de a obesidade ser um fator de risco associado à diabetes tipo 2, testou-se a atividade inibitória dos extratos nesta enzima.

A atividade inibitória da enzima lipase foi determinada de acordo com o método descrito por Kim & Kang (2005), com algumas alterações. Foram adicionados 200 μL de buffer Tris-HCL (100 mM e $\text{pH}=8.2$) juntamente com 20 μL de extrato, 24 μL de enzima (20 mg/mL em tampão Tris-HCL) e 20 μL de p-nitrofenil palmitato (PNP; 5.1 mM). Após 10 min. de incubação a 37°C, foi medida a absorvância a um comprimento de onda de 410 nm. O orlistato foi utilizado neste ensaio como controlo positivo a uma concentração de 1 mg/mL. Foi realizado o controlo de cor nas amostras com os extratos. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição (% I) calculada de acordo com a fórmula indicada em (1).

2.4. Determinação da atividade antioxidante

Sendo o *stress* oxidativo responsável pela patogénese da diabetes, testou-se a atividade antioxidante dos extratos, em que se determinou a capacidade de captura dos radicais DPPH \cdot , ABTS \cdot^+ e NO \cdot .

2.4.1. Atividade de captura do radical 1,1-difenil-2-picrihidrazilo (DPPH \cdot)

O radical DPPH \cdot apresenta-se normalmente livre e estável. A sua redução resulta da aceitação de um eletrão ou um radical hidrogénio (Fig. 3; Hou *et al*, 2004). Apresenta uma baixa taxa de deterioração e de reatividade com a maioria dos compostos, sendo que somente agentes redutores fortes são capazes de reagir com o radical DPPH \cdot estável num modo estequiométrico (Santos *et al*, 2007).

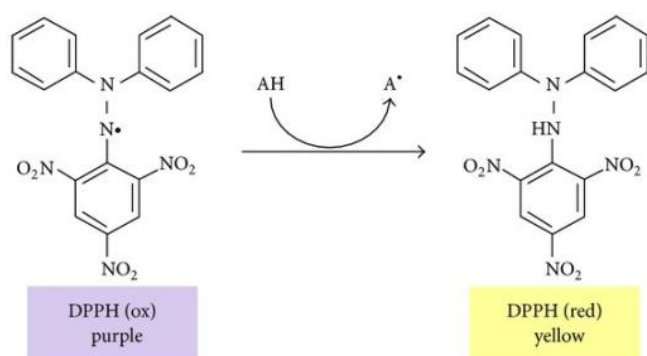


Figura 3. Radical DPPH \cdot (roxo) e a sua forma reduzida (amarelo) (Teixeira *et al*, 2013).

O método DPPH foi realizado tal como proposto por Brand-Williams *et al.* (1995). Em cada poço de uma placa transparente de 96 poços foram adicionados 22 μL da amostra (concentrações até 10 mg/mL) e 200 μL de uma solução metanólica de DPPH (120 μM). As placas foram incubadas durante 30 min. à TA e ao abrigo da luz e a absorvância foi lida a um comprimento de onda de 517 nm. Como controlo positivo foi utilizado o antioxidante sintético butil-hidroxitolueno (BHT) a 1 mg/mL. Nos ensaios com os extratos foi determinado o controlo de cor. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição (% I) calculada de acordo com a fórmula indicada em (1).

2.4.2. Atividade de captura do radical do NO^{*} (óxido nítrico)

O NO reage com o oxigénio promovendo a formação de produtos estáveis, como os nitritos e os nitratos, cuja quantidade dos mesmos pode ser detetada utilizando o reagente de Griess (Fig. 4; Parul *et al.*, 2012). O NO é importante na manutenção cardiovascular, sendo um potente vasodilatador e anticoagulante, contudo, a síntese desmesurada de NO está relacionada com vários processos patológicos, entre os quais a diabetes (Tatsch *et al.*, 2011).

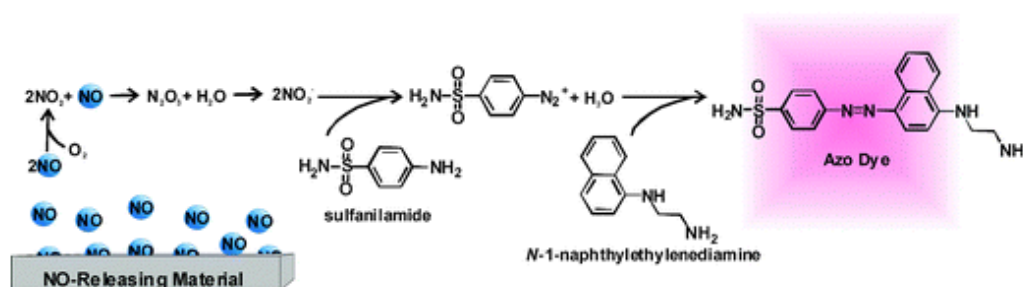


Figura 4. Reação do nitrito (NO₂⁻) com o reagente de Griess. Quanto maior a presença de nitrito, maior a intensidade da coloração rosa (Coneski & Schoenfisch, 2012).

O método utilizando o radical NO^{*} realizou-se de acordo como foi descrito por Baliga *et al.* (2003). Resumidamente, 50 μL dos extratos foram adicionados numa placa de 96 poços juntamente com 50 μL de nitroprussiato de sódio (10 mM) em tampão de fosfato salino (PBS) e incubados durante 90 min à TA e ao abrigo da luz. Posteriormente, foram adicionados 50 μL de reagente de Griess (1% de sulfanilamida e 0.1% de naftil etilenodiamina em 2.5% de HPO₃) e foi medida a absorvância a 546 nm (Biotek Synergy 4). O composto N ω -Nitro-L-arginina metil éster cloridrato (L-NAME) foi utilizado como controlo positivo a uma

concentração de 1 mg/mL. Nos ensaios com os extratos foi determinado o controlo de cor. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição (% I) tal como indicado em (1).

2.4.3. Atividade de captura do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiacolina-6-sulfónico) (ABTS^{•+})

O radical ABTS^{•+} é um catião gerado pela oxidação do ABTS com o persulfato de potássio, e reduzido na presença de um hidrogénio dador de eletrões (Fig. 5). Reage com a maioria dos compostos antioxidantes e não é afetado pela ação de forças iónicas, sendo que pode ser utilizado para determinar a capacidade antioxidante de compostos de natureza hidrofóbica e hidrofílica (Martysiak-Zurowska & Wenta, 2012).

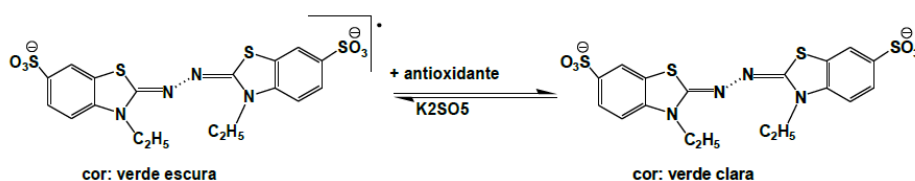


Figura 5. Estabilização do radical ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio (Borges *et al.*, 2011).

A determinação da capacidade de captura do radical ABTS^{•+} foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Re *et al.* (1999). Foi preparada uma solução 7 mM de ABTS, utilizando como agente oxidante uma solução aquosa de persulfato de potássio (2.6 mM). Esta solução foi incubada durante 16h na escuridão e à TA, resultando na solução mãe do radical catiónico ABTS^{•+}. A solução de trabalho de ABTS foi obtida através da diluição da solução mãe em tampão potássico até se obter uma absorvância de 0.70, medida a um comprimento de onda de 734 nm. Em cada poço de uma placa transparente de 96 poços foram colocados 10 µL de cada extrato (até 10 mg/mL) ou tampão fosfato (branco). A reação iniciou-se através da adição de 190 µL da solução de trabalho de ABTS, e a absorvância medida após 6 min. a 734 nm. Como controlo positivo utilizou-se o antioxidante sintético BHT a 1 mg/mL. Nos ensaios com os extratos foi determinado o controlo de cor. Os resultados foram expressos em percentagem de atividade de captação do radical ABTS^{•+}.

2.5. Determinação da atividade quelante de iões metálicos

2.5.1. Determinação da atividade quelante de ferro

A actividade quelante de ferro (Fe^{2+}) foi determinada através da formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina, de acordo com o método descrito por Megías *et al.* (2009), com algumas adaptações. As amostras foram misturadas em microplacas de 96 poços utilizando 200 μL de água destilada, 30 μL de extrato (até 10 mg/mL) e 30 μL de uma solução aquosa de FeCl_2 (0.1 mg/mL). Após 30 minutos à TA, foi adicionado a cada poço 12.5 μL de uma solução aquosa de ferrozina (40 mM). Ao fim de 10 min, leu-se a absorvância das amostras a 562 nm. O controlo positivo utilizado neste ensaio foi o agente quelante ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA), aplicado na concentração de 1 mg/mL. Nos ensaios com os extratos foi determinado o controlo de cor. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição (% I) tal como indicado em (1).

2.5.2. Determinação da actividade quelante de cobre

A actividade quelante de cobre (Cu^{2+}) foi determinada usando o pirocatecol violeta (PV), de acordo com Megías *et al.* (2009), com algumas adaptações. As amostras foram misturadas em microplacas de 96 poços com 200 μL de tampão acetato de sódio (50 mM), 30 μL de extracto, 100 μL de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, e 6 μL de PV. A alteração na cor foi seguida a 632 nm, num leitor de microplacas (BioTek Synergy 4). O EDTA foi o controlo positivo utilizado neste ensaio, na concentração de 1 mg/mL. Nos ensaios com os extratos foi determinado o controlo de cor. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição (% I) tal como indicado em (1).

2.6. Fracionamento dos extractos

Os extratos de *Scenedesmus sp.* foram fracionados por cromatografia em coluna com sílica (fase estacionária), e eluídos com solventes de polaridade crescente (fase móvel): hexano, hexano e diclorometano (4:1), diclorometano, acetato de etilo, acetona, metanol e água. Esta técnica permite a separação de compostos de uma mistura. A velocidade de migração dos compostos varia consoante a sua afinidade para as fases móvel ou estacionária (Touchstone, 1983). Obteve-se um total de 19 frações. A composição das frações obtidas foi analisada por cromatografia em camada em fina (TLC), em que se juntou aquelas que apresentavam um perfil semelhante, obtendo-se um total de 8 frações, que foram ressuspensas em DMSO e armazenadas a 4°C. A figura 7 representa o procedimento da cromatografia em camada em fina (TLC).

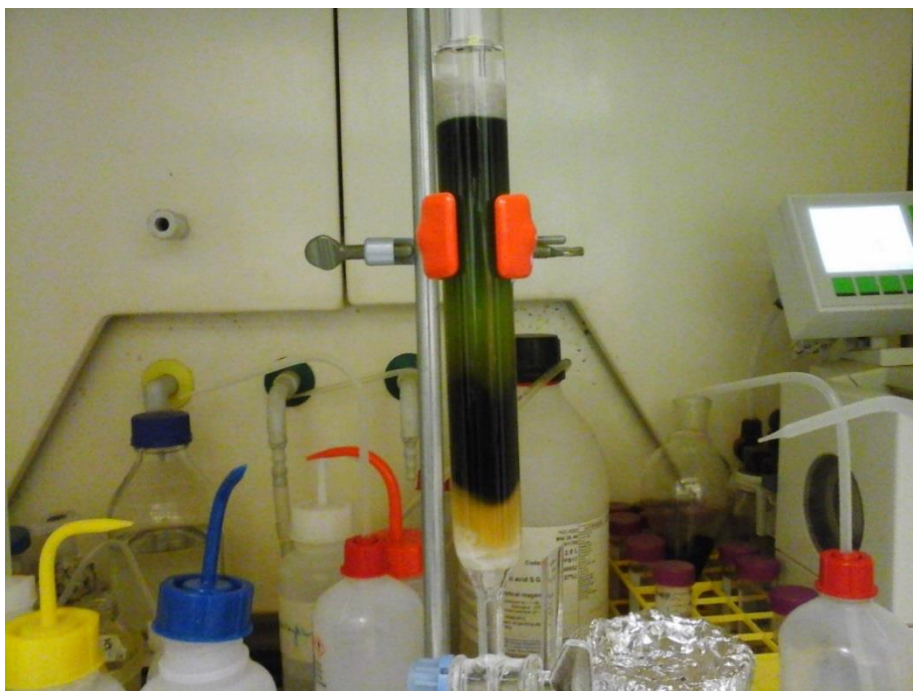


Figura 6. Coluna de fracionamento.

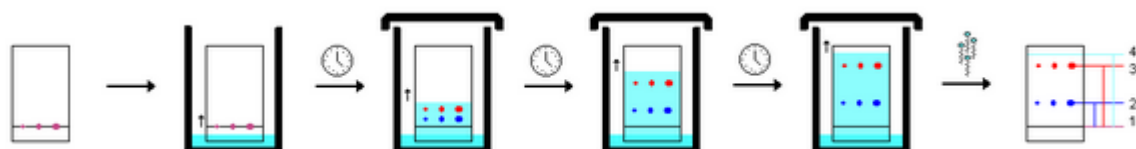


Figura 7. Sequência do ensaio TLC, em que a placa com as amostras foi colocada numa câmara que continha uma mistura de clorofórmio e metanol (9:1). A placa foi embebida pela mistura de solventes e retirado quando o solvente se encontrava a cerca de 1 cm da extremidade oposta da placa. (http://chemwiki.ucdavis.edu/Reference/Lab_Techniques/Thin_Layer_Chromatography).

2.7. Identificação e análise de pigmentos pelo HPLC (High-performance liquid chromatography)

O extrato com a fração mais ativa, armazenado a uma concentração de 10 mg/mL, foi diluído em diluições de 1:10; 1:100 e 1:1000 em acetato de etilo. Posteriormente, as amostras foram analisadas em HPLC-DAD (Agilent 1100 Series LC system, Germany), constituído pelos seguintes módulos: degaseificador a vácuo (G1322A), bomba quaternária (G1311A) e detetor por arranjo de díodos (G1315B). A identificação dos pigmentos foi feita com base na comparação do tempo de retenção dos picos do cromatograma das amostras com os do padrão

(fucoxantina, luteína, violaxantina, neoxantina, zeaxantina, astaxantina, cantaxantina, clorofila α , licopeno e β -caroteno). A quantidade dos diferentes pigmentos foi calculada a partir de curvas padrão de calibração realizadas para cada pigmento.

2.8. Identificação e análise de compostos pelo GC-MS (Gas chromatography–mass spectrometry)

Para a identificação dos compostos, o extrato com a fração mais ativa foi derivatizado com N-Metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida (MSTFA), adicionando 50 μ l de MSTFA a 50 μ l de extrato. Posteriormente, as amostras foram analisadas em GC-MS, utilizando um Agilent GC (6890 Series) – quadrupole MS system (5973), equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m). A identificação dos compostos foi realizada através da comparação dos espectros de massa obtidos com os espectros contidos na biblioteca do NIST (National Institute of Standards and Technology).

2.9. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão (EP). Os dados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA), utilizando o software estatístico SPSS 20.0 (*Statistical Package for the Social Sciences 20.0*), e a diferença entre as médias foi analisada através do teste Duncan. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Para a determinação das concentrações de inibição (IC₅₀) dos diferentes extratos foi utilizado o software GraphPad Prism 6.

3. RESULTADOS

3.1. Extração e fracionamento

Da extração simples de 4 g de *Scenedesmus* sp. em 160 mL de etanol, resultou um rendimento de 13.66% (546.4 mg). Numa primeira análise, testou-se a capacidade inibitória do extrato para a enzima α -glucosidase, a uma concentração de 0.125 mg/mL, obtendo-se um valor de inibição de 21.88%.

Posteriormente realizou-se um fracionamento recorrendo à cromatografia em coluna com sílica (Fig. 6 e 8; Tabela 4), em que obteve-se um total de 19 frações, que foram reduzidas para 8 após os ensaios de cromatografia em camada fina (TLC), em que se juntou aquelas que apresentavam uma composição semelhante. No geral obteve-se um maior rendimento das frações extraídas por solventes de polaridade média (acetato de etilo e acetona).

Tabela 4. Frações obtidas e respetivo rendimento.

Fração	Solvente	Novas frações (TLC)	Peso (mg)	Rendimento (%)*
1	112 mL de hexano	1A	2.4	0.4
2	68 mL de uma mistura de hexano + diclorometano 4:1			
3	32 mL de uma mistura de hexano + diclorometano 4:1	2A	1.9	0.3
4	100 mL de diclorometano			
5	≈ 40 mL de acetato de etilo	3A	132.1	24.2
6	≈ 40 mL de acetato de etilo			
7	≈ 165 mL de acetato de etilo	4A	28.3	5.2
8	≈ 45 mL de acetona	5A	83.7	15.3
9	150 mL de acetona			
10	150 mL de acetona	6A	83.9	15.4
11	150 mL de acetona			
12	150 mL de acetona			
13	≈ 40 mL de metanol			

14	≈ 20 mL de metanol	7A	84.7	15.5
15	≈ 90 mL de metanol			
16	100 mL de metanol			
17	100 mL de acetona	8A	77	14.1
18	100 mL de metanol			
19	≈ 60 mL de água			

*Porcentagem em relação ao extrato seco obtido.

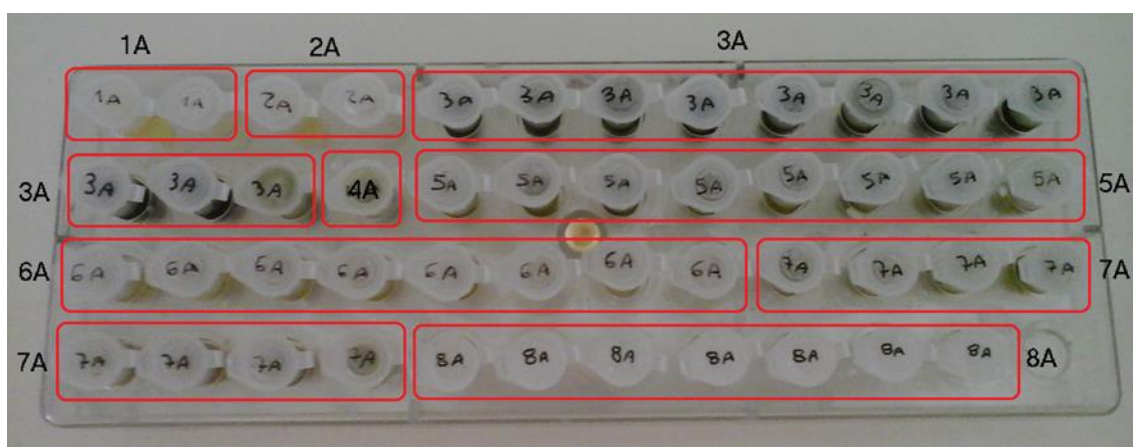


Figura 8. Frações obtidas. 1A – Mistura (Hexano + Diclorometano); 2A – Mistura (Hexano + Diclorometano); 3A – Acetato de etilo; 4A – Acetato de etilo; 5A – Acetona; 6A – Mistura (Acetona + Metanol); 7A – Metanol; 8A – Mistura (Acetona + Metanol + Água). 1A e 2A a 1mg/mL e 3A a 8A a 10 mg/mL. Todos ressuspensos em DMSO.

3.2. Atividade antidiabética

3.2.1 Inibição enzimática das frações

Testou-se cada uma das frações em relação à sua capacidade de inibição enzimática na α -amilase e α -glucosidase (Tabelas 5 e 6). Nas frações 1A e 2A a concentração máxima testada foi de 1 mg/mL devido ao baixo rendimento de extração, e nas restantes foi de 10 mg/mL. No ensaio da inibição enzimática da α -glucosidase de levedura não foi utilizada a concentração

máxima de 10 mg/mL devido aos valores de absorvância muito elevados observados no controlo da cor.

Em relação às frações 1A e 2A, apenas se observou atividade inibitória na 2A no ensaio da α -glucosidase, com um valor de 49,7% de inibição na concentração máxima disponível, não sendo assim possível determinar o IC₅₀. O mesmo se sucedeu em relação à fração 5A para o ensaio da α -amilase. Nas frações 6A e 7A não se observou qualquer atividade. Na fração 8A apenas se observou atividade inibitória na enzima α -glucosidase na concentração de 1 mg/mL, contudo, quando foi posteriormente testada a concentrações superiores, os valores de inibição foram inferiores aos obtidos a 1 mg/mL. A fração 4A, apesar de apresentar atividade inibitória para ambas as enzimas, apenas foi possível determinar o IC₅₀ para a enzima α -glucosidase devido à quantidade reduzida de biomassa da fração. A fração 3A foi a que manifestou maior atividade inibitória para a enzima α -glucosidase e foi a única em que foi possível determinar o IC₅₀ para o teste da α -amilase, apesar de não ser testada na concentração máxima de 10 mg/mL devido aos elevados valores de absorvância verificados no controlo da cor. Assim sendo, as frações 3A e 4A foram as mais promissoras para prosseguir os ensaios de atividade antidiabética por apresentarem atividade inibitória contra ambas as enzimas.

Tabela 5. Atividade inibitória das diferentes frações na enzima α -glucosidase de levedura.

Fração	α -glucosidase	
	Inibição a 0.5 mg/mL	Inibição a 1 mg/mL
1A	nd	na
2A	nd	47.90 \pm 4.03 ^{a,b}
3A	85.12 \pm 4.95 ^a	nd
4A	37.50 \pm 8.21 ^b	56.01 \pm 9.94 ^a
5A	nd	na
6A	nd	na
7A	nd	na
8A	na	38.06 \pm 6.04 ^b

Os valores representam médias \pm EP de 6 replicados. O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extratos à mesma concentração. Os valores seguidos com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$). “na” \rightarrow não ativo; “nd” \rightarrow não determinado.

Tabela 6. Atividade inibitória das diferentes frações na enzima α -amilase.

Fração	α -amilase	
	Inibição a 1 mg/mL	Inibição a 10 mg/mL
1A	na	nd
2A	na	nd
3A	28.39 \pm 0.95	nd
4A	nd	122.13 \pm 1.79 ^a
5A	nd	44.29 \pm 1.56 ^b
6A	nd	na
7A	nd	na
8A	nd	na

Os valores representam médias \pm EP de 6 replicados. O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extratos à mesma concentração. Os valores seguidos com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$). “na” \rightarrow não ativo; “nd” \rightarrow não determinado.

3.2.2. Inibição da alfa-glucosidase

Considerando os resultados obtidos anteriormente (Tabela 5), as frações 3A e 4A foram testadas para inibição da enzima α -glucosidase (Fig. 9) e a 3A (que apresentou maior rendimento) foi ainda testada para inibição da α -amilase (Fig. 10). Em relação ao ensaio com a enzima α -glucosidase de levedura (Fig. 9), verificou-se um aumento da atividade inibitória com o aumento da concentração no extrato com a fração 4A, no entanto, esse aumento foi mais pronunciado no controlo positivo (acarbose), já que a 1 mg/mL houve diferenças significativas entre o extrato e o controlo positivo, com o extrato a apresentar maior atividade, e a 5 mg/mL não se verificaram diferenças estatisticamente significativas. O extrato com a fração 3A, testado a uma concentração máxima de 0,5 mg/mL foi o que apresentou maior atividade em relação aos restantes ensaios (85.12%). Os extratos também foram testados para inibição da enzima α -glucosidase de mamífero, contudo, estes não revelaram atividade.

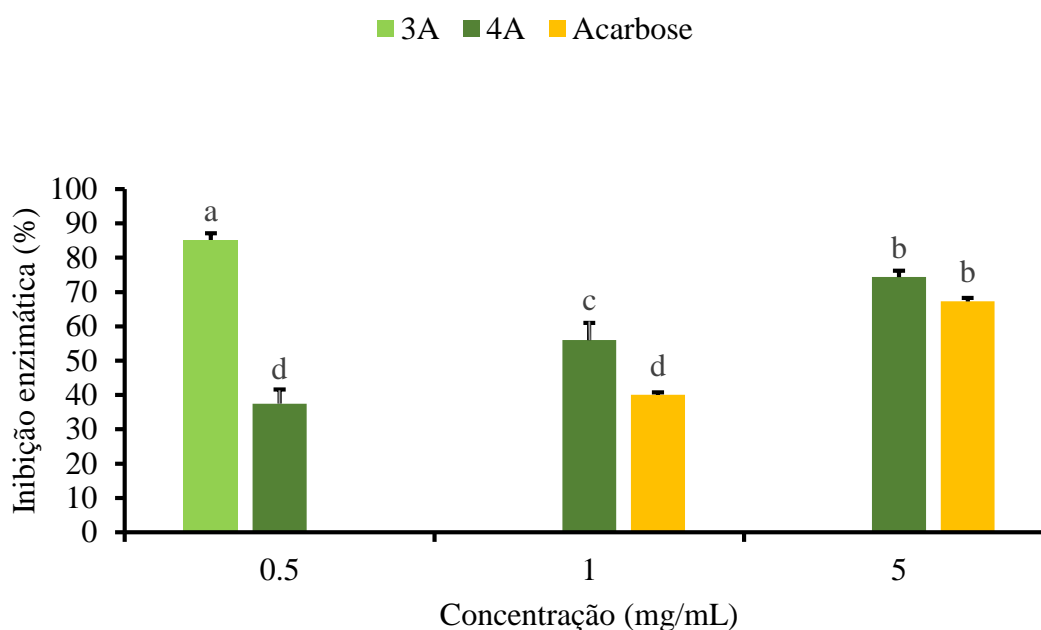


Figura 9. Atividade inibitória das frações 3A e 4A do extrato de *Scenedesmus* sp. na enzima α -glucosidase. Os valores representam as médias \pm EP de 6 replicados. Acarbose (controle positivo, a 1 e 5 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extratos e entre concentrações diferentes. Colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

3.2.3. Inibição da alfa-amilase

No ensaio com a enzima α -amilase (Fig. 10), não se verificaram diferenças significativas entre os extratos de etanol e da fração 3A e o controle positivo (acarbose) a 1 mg/mL. No entanto, a 2 mg/mL, houve diferenças significativas entre o extrato de etanol e da fração 3A. Os valores da atividade inibitória dos extratos variaram entre 24.29% (extrato de etanol a 1 mg/mL) e 62.57% (extrato da fração 3A a 2 mg/mL).

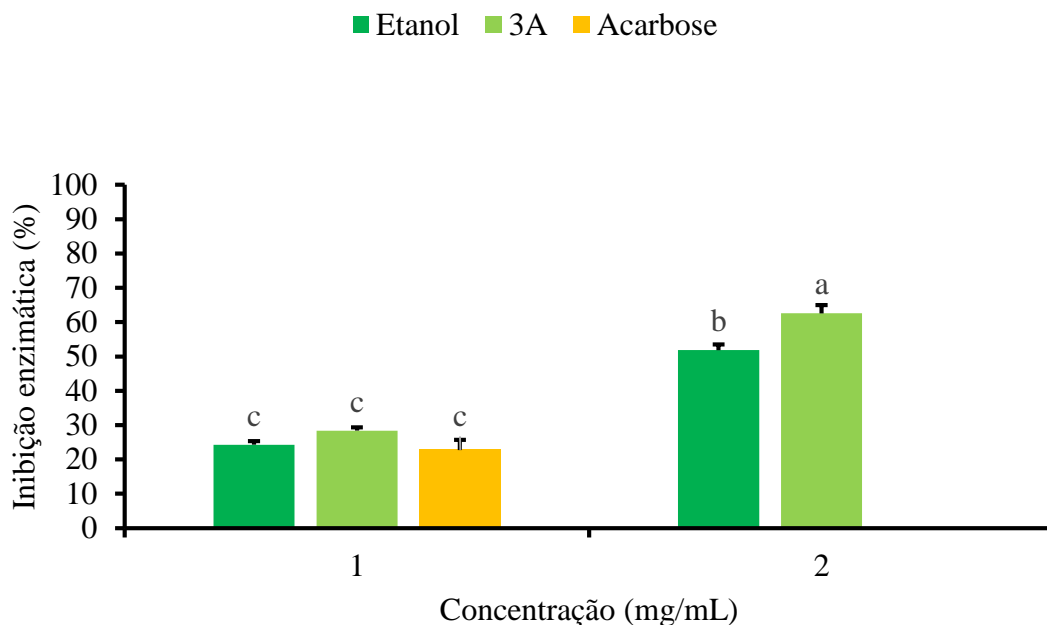


Figura 10. Atividade inibitória da frações 3A e do extrato cru de *Scenedesmus* sp. na enzima α -amilase. Os valores representam as médias \pm EP de 6 replicados. Acarbose (controle positivo, 1 mg/mL). Colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

3.2.4. IC₅₀ da atividade antidiabética

Comparando estatisticamente os valores de IC₅₀, o controle positivo revelou sempre valores de IC₅₀ estatisticamente diferentes dos obtidos nos ensaios com os extratos, sendo que apenas nos ensaios da inibição enzimática da α -glucosidase de levedura e da α -amilase, os extratos revelaram valores de IC₅₀ mais baixos que o controle positivo. Entre os extratos, apenas no ensaio da inibição enzimática da α -amilase não se verificaram diferenças significativas. Nos ensaios de inibição enzimática da α -glucosidase de mamífero e da lipase, os extratos não demonstraram atividade ou esta foi muito baixa, não sendo possível nestes casos determinar o IC₅₀.

Tabela 7. Atividade inibitória das frações 3A, 4A e do extrato cru (em etanol) nas diferentes enzimas testadas (IC₅₀, mg/mL).

Ensaio	Extrato cru	Fração 3A	Fração 4A	C +	
α -Amilase	1.99 \pm 0.02 ^a	1.58 \pm 0.06 ^a	nd	Acarbose	6.76 \pm 0.22 ^b
α -Glucosidase (a)	nd	0.29 \pm 0.01 ^a	0.80 \pm 0.06 ^b		1.70 \pm 0.07 ^c
α -Glucosidase (b)	nd	nd	nd		0.28 \pm 0.06
Lipase	nd	nd	nd	Orlistato	0.23* \pm 0.00

a) Glucosidase proveniente de levedura

b) Glucosidase de mamífero

* Resultado em μ g/mL

Os valores representam médias \pm EP de 6 replicados. O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extratos relativamente ao mesmo ensaio. Os valores seguidos com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$). “nd” \rightarrow não determinado.

3.3. Atividade antioxidante

3.3.1. Captura do radical DPPH

A fração 3A, da qual havia maior quantidade de extrato e onde se verificaram os melhores resultados na atividade antidiabética, foi ainda testada para a atividade antioxidante nomeadamente, captura de radicais (DPPH^{*}, ABTS^{**} e NO^{*}) e atividade quelante de ferro e de cobre.

Relativamente ao método DPPH (Fig. 11), o controlo positivo (BHT), testado a 1 mg/mL, revelou apresentar maior atividade antioxidante que os extratos a 1, 2 e 5 mg/mL. Em relação aos extratos, os de etanol foram os que revelaram maior atividade. Apenas entre o extrato de etanol testado a 1 mg/mL e o extrato da fração 3A testado a 2 mg/mL não se verificaram diferenças significativas. Os valores da atividade antioxidante dos extratos variaram entre 2.17% (extrato da fração 3A a 1 mg/mL) e 68.37% (extrato de etanol a 5 mg/mL).

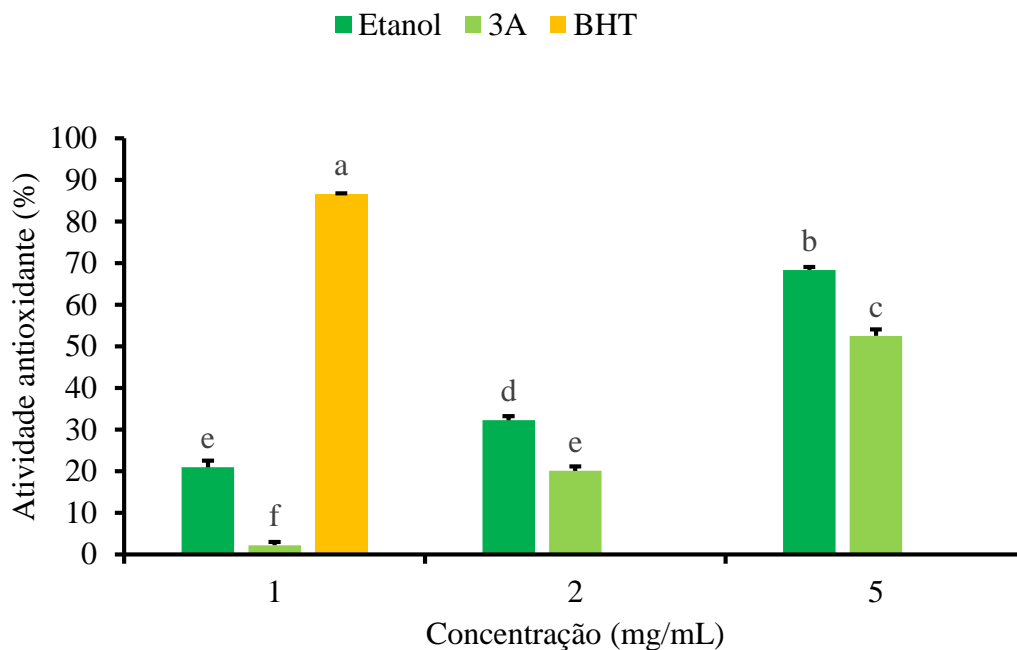


Figura 11. Atividade antioxidante (%) da fração 3A e do extrato cru de *Scenedesmus* sp. determinada através do método de captura do radical DPPH. Os valores representam as médias \pm EP de 6 replicados. BHT (controlo positivo, 1 mg/mL). Colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

3.3.2. Captura do radical ABTS

Tal como se verificou para o DPPH, o controlo positivo (BHT) demonstrou apresentar maior atividade de captura do radical ABTS que os extratos e os extratos de etanol foram mais ativos que os extratos da fração 3A (Fig. 12). Verificaram-se diferenças significativas em todos os ensaios. Os valores da atividade de captação do radical ABTS^{•+} dos extratos variaram entre 9.91% (extrato da fração 3A a 1 mg/mL) e 65.61% (extrato de etanol a 5 mg/mL). No ensaio da atividade de captação do radical NO[•] os extratos não demonstraram atividade.

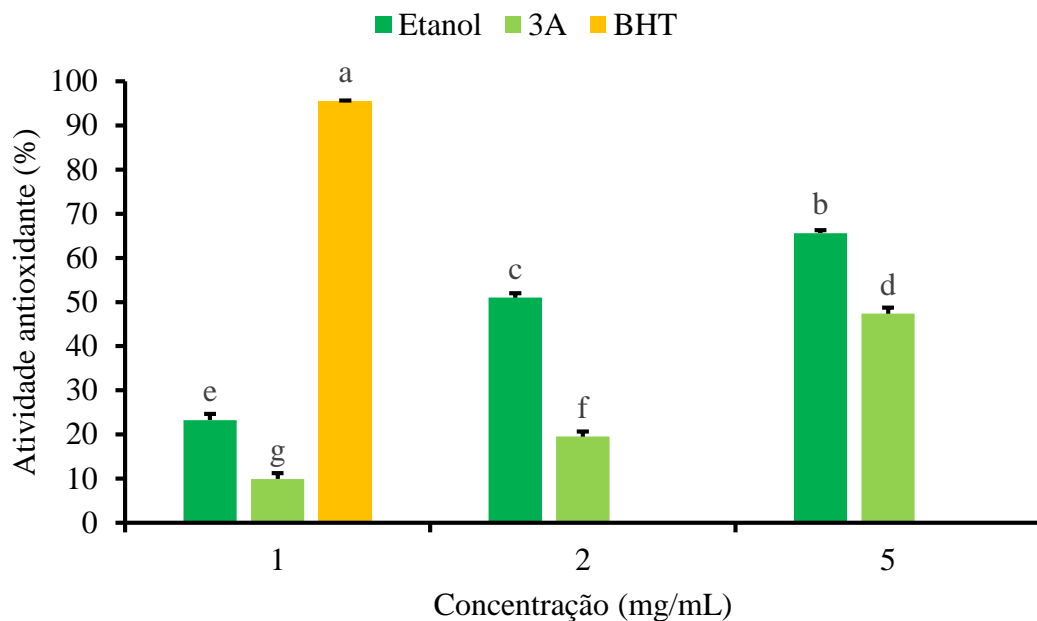


Figura 12. Atividade antioxidante (%) da fração 3A e do extrato cru de *Scenedesmus* sp. determinada através do método de captura do radical ABTS. Os valores representam as médias \pm EP de 6 replicados. BHT (controlo positivo, 1 mg/mL). Colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

3.3.3. Atividade quelante para o ferro

No ensaio da atividade quelante de ferro (Fig. 13), o controlo positivo (EDTA) a 1 mg/mL revelou maior atividade quelante que os extratos. Os extratos da fração 3A foram os que revelaram maior atividade quelante para o ferro. Apenas entre o extrato da fração 3A a 0.5 mg/mL e o extrato de etanol a 1 mg/mL não se verificaram diferenças significativas. Nos extratos, os valores da atividade quelante variaram entre 15.14% (extrato de etanol a 0.5 mg/mL) e 75.64% (extrato da fração 3A a 2 mg/mL).

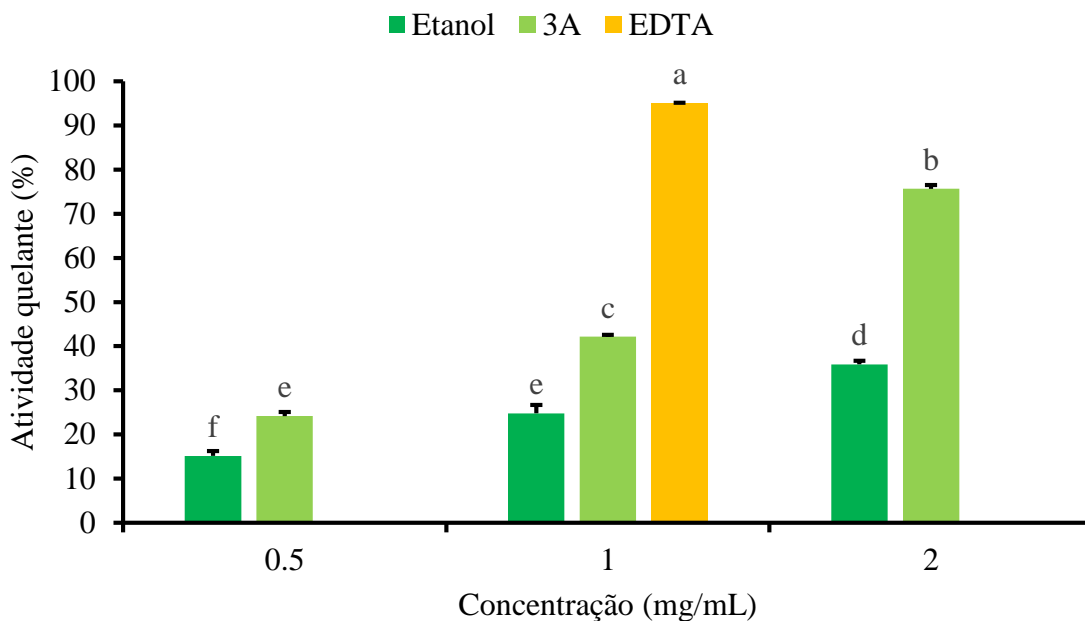


Figura 13. Atividade quelante (%) de ferro da fração 3A e do extrato cru de *Scenedesmus* sp. Os valores representam as médias \pm EP de 6 replicados. EDTA (controle positivo, 1 mg/mL). Colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

3.3.4. Atividade quelante para o cobre

Tal como se sucedeu no ensaio para a atividade quelante de ferro, no ensaio para a atividade quelante de cobre (Fig. 14), o controlo positivo revelou maior atividade quelante que os extratos. A 1 mg/mL não houve diferenças significativas entre os extratos, no entanto, o extrato com a fração 3A foi o que demonstrou um maior aumento da atividade quelante de cobre com o aumento da concentração. Nos extratos, os valores da atividade quelante variaram entre 15.61% (extrato de etanol a 1 mg/mL) e 84.25% (extrato da fração 3A a 8 mg/mL).

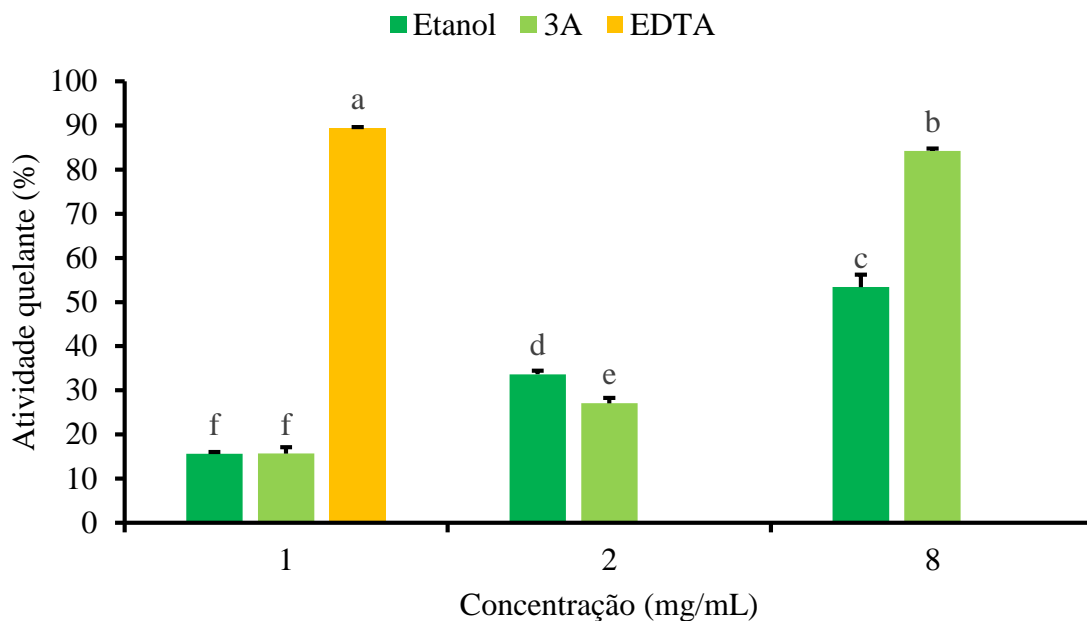


Figura 14. Atividade quelante (%) de cobre da fração 3A e do extrato cru de *Scenedesmus* sp. Os valores representam as médias \pm EP de 6 replicados. EDTA (controle positivo, 1 mg/mL). Colunas com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$).

3.3.5. IC₅₀ da atividade antioxidante

Em relação à atividade antioxidante, os valores de IC₅₀ obtidos pelo extrato cru de etanol foram mais baixos do que aqueles que foram revelados pelo extrato com a fração 3A, sendo a discrepância maior no ensaio ABTS (2.41 e 6.71 mg/mL) que no ensaio DPPH (3.03 e 4.26 mg/mL). Quanto à atividade quelante, os valores de IC₅₀ obtidos pelo extrato com a fração 3A foram superiores aos que foram revelados pelo extrato cru de etanol, sendo que a discrepância no ensaio da atividade quelante de ferro (1.10 e 3.66 mg/mL) muito superior àquela que se observou no cobre (3.82 e 5.14 mg/mL). No ensaio da atividade de captação do radical NO*, os extratos não demonstraram atividade ou esta foi muito baixa, não sendo possível nestes casos determinar o IC₅₀.

Tabela 8. Atividade antioxidante determinada através dos métodos DPPH, ABTS e NO e atividade quelante de ferro e de cobre (IC₅₀, mg/mL) da fração 3A e do extrato cru de *Scenedesmus* sp.

Ensaio	Extrato cru	Fração 3A	Fração 4A	C +	
ABTS	2.41 ± 0.12 ^b	6.71 ± 0.25 ^c	nd	BHT	0.10 ± 0.00 ^a
DPPH	3.03 ± 0.07 ^b	4.26 ± 0.19 ^c	nd		0.21 ± 0.01 ^a
NO	nd	nd	nd	L-NAME	0.48 ± 0.01
Quelante de cobre	5.14 ± 0.17 ^c	3.82 ± 0.07 ^b	nd	EDTA	0.45 ± 0.01 ^a
Quelante de ferro	3.66 ± 0.13 ^c	1.10 ± 0.02 ^b	nd		0.22 ± 0.00 ^a

Os valores representam médias ± EP de 6 replicados. O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extratos relativamente ao mesmo ensaio. Os valores seguidos com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ($p < 0.05$). “nd” → não determinado.

3.4. Determinação de pigmentos por HPLC

Não foi detetada a presença de pigmentos (fucoxantina, luteína, violaxantina, neoxantina, zeaxantina, astaxantina, cantaxantina, clorofila α , licopeno e β -caroteno) no extrato da fração 3A nas várias diluições (1:10, 1:100 e 1:1000), devido à ausência de picos nas curvas de calibração.

3.5. Caracterização química por GC-MS

Após a análise por GC-MS, os compostos encontrados na fração 3A (extraída com acetato de etilo) foram essencialmente neofitadieno, fitol e ácidos gordos (Tabela 9). O neofitadieno foi o composto que demonstrou ter o pico com maior área relativa (40.576%). Dos ácidos gordos destacou-se o ALA (ácido α -linolólico). No entanto, nos picos em que o tempo de retenção foi mais baixo, não foi possível identificar compostos (Tabela 9; Fig. 15).

Tabela 9. Caracterização química por GC-MS.

Tempo de retenção (min)	Nome do composto	Fórmula molecular	Área relativa (%)
4.063	ni	ni	18.786
4.242	ni	ni	0.877
4.342	ni	ni	0.249
4.422	ni	ni	0.753
4.608	ni	ni	3.127
4.703	ni	ni	1.312
5.266	ni	ni	0.294
7.773	ni	ni	0.334
7.984	Neofitadieno	C ₂₀ H ₃₈	40.576
8.110	Fitol	C ₂₀ H ₄₀ O	27.899
8.818	Ácido araquidônico	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	0.509
8.930	Ácido palmitelaidico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	0.456
9.026	Ácido palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	1.071
9.968	Ácido α -linolélico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	3.756

“ni” → não identificado

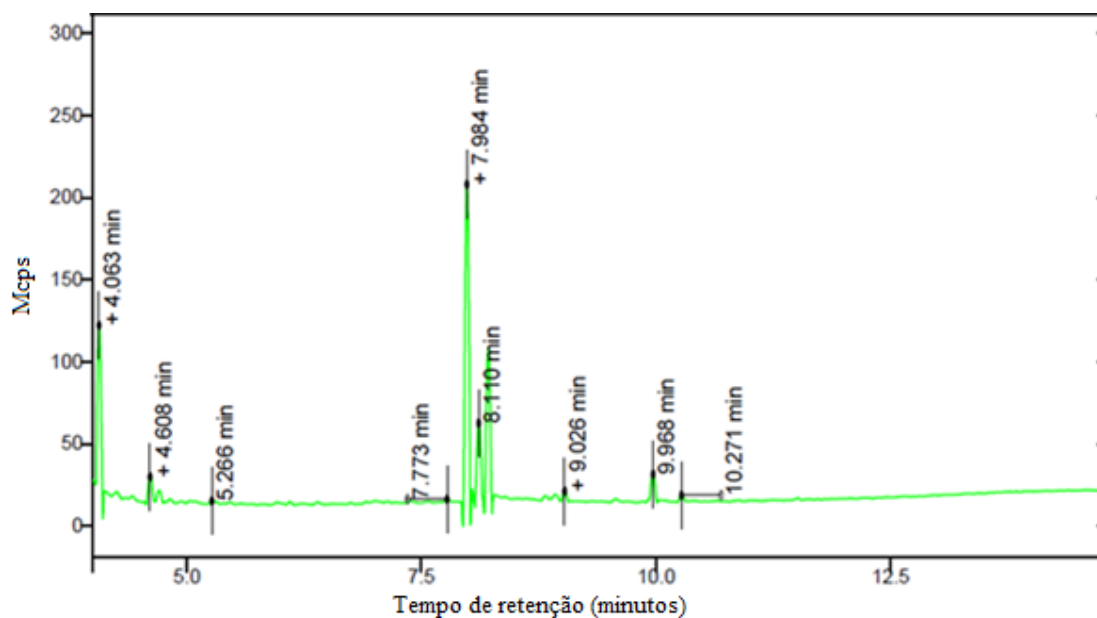


Figura 15. Cromatograma da análise por GC-MS da fração 3A.

4. DISCUSSÃO

4.1. Inibição enzimática

Para determinar a atividade antidiabética de extratos de *Scenedesmus* sp. foram realizados ensaios de inibição enzimática, sendo que a α -amilase e a α -glucosidase foram as enzimas a ser testadas. Estas enzimas são responsáveis pela degradação do amido, que constitui a fonte primária de obtenção de glucose no organismo (Kim *et al*, 2014).

Os valores de inibição enzimática da α -glucosidase de levedura obtidos nos extratos das frações 3A e 4A da microalga *Scenedesmus* sp. foram superiores ao do controlo positivo (Tabela 7), sendo que as respetivas frações foram extraídas com acetato de etilo (Tabela 4). Na fração 3A chegou-se a obter um valor de inibição de 85.12% a uma concentração de 0.5 mg/mL, que foi superior ao verificado por Cannell *et al*. (1987), em que se obteve uma inibição de 60% em extratos metanólicos de *Scenedesmus quadricauda* e de *Scenedesmus subspicatus*, não sendo referida qual a concentração que foi usada. Para a enzima α -glucosidase, foram testadas todas as frações obtidas (Tabela 5), e a fração 3A destacou-se claramente como a fração mais ativa, com um IC₅₀ de 0.29 mg/mL (Tabela 7). Nas restantes frações, apenas a fração 4A obteve atividade suficiente para se poder determinar o IC₅₀, que foi de 0.80 mg/mL. Assim sendo, o composto ativo estará possivelmente mais concentrado na fração 3A. O mesmo não sucedeu na α -glucosidase de mamífero, com os extratos a revelarem muito pouca ou nenhuma atividade, não sendo possível determinar o IC₅₀ (Tabela 7). Portanto, elevados valores de inibição enzimática na α -glucosidase de levedura não se traduzem necessariamente em valores de inibição da mesma ordem de grandeza para a α -glucosidase de mamífero. Esta discrepância de valores entre os dois tipos de α -glucosidases está de acordo com estudos anteriores. Tudo indica que poderá tratar-se de diferenças estruturais entre as enzimas (Shai *et al*, 2011), como o facto de o domínio catalítico das diferentes α -glucosidases variar na sua localização e os compostos bioativos presentes nos extratos apresentarem maior afinidade para o domínio catalítico da α -glucosidase de levedura, que se traduz nos resultados obtidos (Chiba, 1997).

Relativamente à enzima α -amilase, também os extratos revelaram um maior poder inibitório que o controlo positivo (Tabela 7), sendo que não se observaram diferenças significativas entre os valores de IC₅₀ observados no extrato cru de etanol (1.99 mg/mL) e a

fração 3A (1.58 mg/mL), indicando que a concentração de compostos bioativos responsáveis pela inibição enzimática da α -amilase não difere significativamente entre os diferentes extratos. Em estudos anteriores relativos ao ensaio da α -amilase, foi demonstrado em Cannell *et al.* (1987) que extratos metanólicos de *Spirogyra varians* e *Zygnema* sp. (microalgas da classe Chlorophyceae) inibiam a atividade da respectiva enzima em 55%, sem no entanto, ser referida a concentração utilizada.

Nos ensaios de inibição enzimática também foi testada a lipase, uma enzima responsável pela degradação e absorção de lípidos. O interesse de utilizar esta enzima num estudo relacionado com a diabetes advém do facto de a obesidade constituir um fator de risco associado a diabetes tipo 2. Atualmente, ainda há muito poucos compostos inibidores desta enzima usados em medicamentos e aprovados pela FDA (Food and Drug Administration). O orlistato é um dos casos (Birari & Bhutani, 2007).

Os extratos de *Scenedesmus* sp. não apresentaram atividade inibitória enzimática na lipase (Tabela 7). Os inibidores enzimáticos da lipase provenientes de fontes naturais permanecem ainda pouco explorados, sendo que vários compostos têm sido descritos como potenciais inibidores da lipase, compostos esses pertencentes ao grupo dos polifenóis, dos terpenos e das saponinas (metabólitos secundários das plantas, sendo os constituintes primários das raízes e rizomas) (Birari & Bhutani, 2007).

O facto de os extratos não demonstrarem atividade nos ensaios da α -glucosidase de mamífero e da lipase também poderá estar relacionado com uma limitação do método, já que nos comprimentos de onda utilizados para os ensaios (405 nm para a α -glucosidase e 410 para a lipase), facilmente se obtinham elevados valores de absorvância no controlo da cor, impossíveis de ser lidos pelo equipamento, dado que para estes ensaios foram utilizadas concentrações baixas (até 2 mg/mL).

4.2. Atividade antioxidante e quelante (Fe^{2+} e Cu^{2+})

O *stress* oxidativo é o principal fator que conduz à disfunção das células β e à resistência à insulina, bem como o agravamento de complicações microvasculares e cardiovasculares associadas à diabetes (Ceriello & Motz, 2004). Portanto, compostos com atividade antioxidante poderão constituir uma mais-valia para o tratamento da diabetes.

Na determinação da atividade antioxidante de extratos de *Scenedesmus* sp. foram utilizados três métodos que, basicamente, consistem na captação de radicais livres, que neste estudo foram os radicais DPPH \cdot , ABTS \cdot^{+} e NO \cdot .

Nos métodos DPPH e ABTS, o extrato cru de etanol revelou uma atividade antioxidante superior ao extrato com a fração 3A (Tabela 8). A presença de determinados compostos antioxidantes que poderão estar presentes no extrato cru e não na fração 3A poderá justificar esta discrepância, já que após o fracionamento, os vários compostos com atividade presentes no extrato cru ficam distribuídos pelas frações levando a uma diminuição da atividade antioxidante, tal como foi observado em Wu *et al.* (2012). No método DPPH, os valores de IC₅₀ obtidos pelo extrato cru de etanol e pelo extrato da fração 3A foram de 3.03 e 4.26 mg/mL, respetivamente, o que não difere muito do que foi obtido por Custódio *et al.* (2014), em que o IC₅₀ de extratos de acetona de *Scenedesmus* sp. foi de 3.56 mg/mL, além de que, tanto o etanol como o acetato de etilo, solventes de polaridade média, não diferem muito na sua polaridade em relação à acetona. Tendo em conta que o extrato de acetona foi o que teve maior atividade antioxidante em Custódio *et al.* (2014) e tendo em conta os resultados obtidos neste estudo, os compostos com atividade antioxidante presentes em *Scenedesmus* sp. parecem ser essencialmente de polaridade média. Entretanto, no ensaio da atividade de captação do radical NO*, os extratos não demonstraram atividade (Tabela 8). Alguns compostos fenólicos têm sido descritos como potenciais captadores do radical NO*, como por exemplo o ácido gálico (Kumaran & Karunakaran, 2006). A microalga *Scenedesmus* sp. não é propriamente das mais ricas em compostos fenólicos, como foi demonstrado por Custódio *et al.* (2014).

Também neste estudo foi avaliada a atividade quelante dos iões metálicos Fe²⁺ e Cu²⁺. O extrato com a fração 3A revelou uma maior atividade quelante para o ferro e o cobre que o extrato cru de etanol (Tabela 8), o que poderá indicar uma maior concentração de compostos com atividade quelante para estes iões metálicos na fração 3A. Esta diferença foi bastante mais notória em relação ao ferro, e tendo em conta que elevados níveis de ferro podem estar associados à patogénese da diabetes, este poderá ser considerado um resultado promissor. Em relação a estudos anteriores com *Scenedesmus* sp., de acordo com Custódio *et al.* (2014) os extratos de hexano desta espécie revelaram um IC₅₀ de 0.73 e 0.91 mg/mL nos ensaios da atividade quelante do ferro e do cobre, respetivamente, o que é inferior ao obtido neste estudo. Assim sendo, a actividade quelante dos iões metálicos em *Scenedesmus* sp. também poderá estar presente em compostos apolares.

Contrariamente ao que se sucedeu nos ensaios de inibição enzimática, nem nos ensaios da atividade antioxidante, nem nos ensaios da atividade quelante o IC₅₀ dos extratos foi inferior ao do controlo positivo. Isto deve-se ao facto de compostos puros como o BHT e EDTA manifestarem bioatividades em concentrações muito reduzidas e os extratos

representam uma mistura complexa de compostos em que não se conhece a origem da sua atividade, além de que os principais compostos com atividade encontram-se diluídos.

4.3. Caracterização química

Da caracterização química do extrato da fração 3A em GC-MS resultou a identificação de vários compostos, entre os quais o neofitadieno, o fitol e ácidos gordos (ALA, palmítico, araquidónico e palmitelaidico) (Tabela 9), no entanto, não foi possível identificar compostos nos picos em que o tempo de retenção foi mais baixo. A identificação de compostos por parte do GC-MS resulta da comparação do espectro de massa obtido com os espectros contidos na biblioteca do NIST, possivelmente, neste caso, não foi encontrada nenhuma correspondência na biblioteca para estes picos. O neofitadieno foi o composto encontrado em maior quantidade, seguido do fitol. Tanto o neofitadieno como o fitol são compostos que já foram identificados em *Scenedesmus* sp., utilizando a mesma técnica cromatográfica (Kim *et al*, 2014). O neofitadieno é um diterpeno que é produzido pela desidratação do fitol (Davis & Nielson, 1999), apresenta atividade antimicrobiana (Morais *et al*, 2015), sendo considerado um potente inibidor enzimático da carbamato quinase (Shaikh *et al*, 2015). O fitol é um diterpeno encontrado nas clorofilas, que apresenta bioatividade antioxidante e antimicrobiana (Moraes *et al*, 2014), sendo também considerado um precursor de formas sintéticas das vitaminas E e K1 (Kanimozhi & Bai, 2012). Num estudo relacionado com a atividade antioxidante do fitol, este apresentou uma atividade de captação do radical DPPH• de 48% a uma concentração de 0.1 mg/mL (Pejin *et al*, 2014).

Em relação à diabetes, o fitol é um exemplo de um composto com propriedades antidiabéticas, que apresenta um potencial efeito no tratamento de distúrbios associados à resistência à insulina (Elmazar *et al*, 2013). Aparentemente, nem o fitol, nem o neofitadieno foram utilizados em ensaios de inibição das enzimas α -amilase e α -glucosidase, apesar deste último ser referido como um inibidor enzimático. Portanto, neste trabalho, o neofitadieno poderá ser um dos principais responsáveis pela inibição enzimática.

Dos ácidos gordos encontrados, dois classificam-se como polinsaturados (ácido α -linolélico e araquidónico), sendo o ácido α -linolélico (ALA) considerado um ω -3 e o ácido araquidónico um ω -6 (Nettleton, 1995). O ácido palmítico, outro dos ácidos gordos encontrados, classifica-se como um ácido gordo saturado (Nettleton, 1995) e o ácido palmitelaidico como um ácido gordo trans (C16:1 trans-9) (Kadegowda *et al*, 2014). Destes, pelo menos o ALA (C18:3) e o ácido palmítico (C16:0) já foram identificados por GC em

Scenedesmus obliquus (Mata *et al*, 2013). O ácido araquidônico (C20:4) também já foi identificado em *Scenedesmus obtusiusculus* em baixas concentrações (Krienitz & Wirth, 2006). O ácido α -linoléico foi o ácido gordo presente em maior quantidade, seguido do ácido palmítico (Tabela 9). O ácido α -linoléico caracteriza-se por ser um precursor na formação de ω -3 de cadeia longa, como o EPA e o DHA (ácido docosahexaenóico), contudo, a taxa de conversão no organismo é relativamente baixa, já que este é rapidamente oxidado após a digestão (Pan *et al*, 2012). De acordo com estudos anteriores, a taxa de conversão é geralmente inferior a 10% (Swanson *et al*, 2012). O ALA também é um composto que apresenta propriedades neuroprotetoras e anti-inflamatórias (Blondeau *et al*, 2015). Em relação ao ácido palmítico, este já demonstrou possuir atividade antitumoral, num estudo realizado com a alga vermelha *Amphiroa zonata* (Harada *et al*, 2002). De acordo com Su *et al*. (2013), os ácidos gordos, sobretudo os insaturados, revelam uma capacidade inibitória para a α -glucosidase de levedura superior àquela verificada pela acarbose, em que o ácido palmítico, o ácido araquidônico e o ALA revelaram um IC₅₀ de 0.749, 0.211 e 0.170 mM, respectivamente, enquanto que a acarbose ficou-se pelos 2.87 mM. Em relação à α -amilase, a acarbose demonstrou um poder inibitório superior, com um IC₅₀ de 0.0361 mM, enquanto que nos ácidos gordos este foi superior a 3 mM. Portanto, alguma da atividade inibitória dos extratos em relação à α -glucosidase poderá advir dos ácidos gordos.

Em relação à possibilidade de a microalga *Scenedesmus* sp. ser utilizada como fonte de compostos para o tratamento da diabetes tipo 2, seria necessário realizar testes de toxicidade e citotoxicidade para os diferentes compostos, bem como avaliar a sua atividade *in vivo*, de forma a verificar a segurança dos mesmos e a relação custo-benefício. Por enquanto, tendo em conta todos os resultados obtidos, a *Scenedesmus* sp. poderá ser utilizada como alimento funcional, dada à sua potencial atividade antidiabética.

5. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

A espécie *Scenedesmus* sp. revelou conter compostos com elevada atividade antidiabética, com elevados valores de inibição enzimática para a α -glucosidase e para a α -amilase. Na variante de mamífero da α -glucosidase e na lipase, os extratos não revelaram atividade inibitória.

Em relação aos ensaios das atividades antioxidante e quelante de ferro e de cobre, verificou-se uma atividade antioxidante mais significativa no extrato cru, com os métodos DPPH e ABTS, e uma atividade quelante do ferro e do cobre mais significativa na fração 3A. Estes resultados levam a concluir que há compostos com atividade antioxidante no extrato cru de etanol que não estão presentes na fração 3A ou que estes estão mais concentrados no extrato cru, e que os compostos com atividade quelante do ferro e do cobre estão mais concentrados na fração 3A que no extrato cru. De referir que o extrato da fração 3A apresentou uma maior capacidade de quelar o ferro do que o cobre. O fracionamento pode levar a que ocorra perda de atividade, caso o composto ou compostos bioativos se encontrem distribuídos pelas diferentes frações, ou pode levar a um aumento, caso estes se encontrem especificamente em determinadas frações.

No geral podem-se considerar promissores os resultados obtidos no extrato da fração 3A em relação aos ensaios de inibição enzimática para a α -glucosidase e para a α -amilase e da atividade quelante para o ferro.

A caracterização química do extrato da fração 3A de *Scenedesmus* sp. resultou na identificação de dois terpenos (neofitadieno e fitol) associados a pigmentos fotossintéticos e de quatro ácidos gordos (ALA, araquidónico, palmítico e palmitelaídico), estes últimos em menor quantidade. Destes, apenas os ácidos gordos estão presentes em estudos concretos envolvendo ensaios de inibição enzimática da α -glucosidase e da α -amilase, em que se verificaram elevados valores de inibição para a α -glucosidase. Em relação aos compostos maioritariamente presentes, o neofitadieno é referido como um inibidor enzimático e o fitol como um composto com atividade antioxidante. Assim sendo, a atividade inibitória das enzimas em geral parece estar associada ao neofitadieno e a atividade antioxidante ao fitol. No caso da α -glucosidase, a atividade inibitória também poderá estar associada aos ácidos gordos.

Para uma melhor caracterização dos compostos bioativos encontrados, seria necessário no futuro isolar os diferentes compostos e testá-los novamente para as diferentes

bioatividades, e também realizar testes de toxicidade e citotoxicidade para verificar a segurança dos mesmos. O neofitadieno é um composto pouco conhecido ao nível das atividades biológicas, sendo que é necessário um estudo mais aprofundado para avaliar as suas potencialidades. Para já, a *Scenedesmus* sp. revela-se interessante como alimento funcional, sendo que para o tratamento da diabetes tipo 2 seria necessária uma melhor caracterização dos compostos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Dabbas MM, Suganuma T, Kitahara K, Hou DX & Fujii M (2006) Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of *Varthemia iphionoides* Boiss. extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. **108**: 287-293.

Arredondo M & Núñez MT (2005) Iron and copper metabolism. *Molecular Aspects of Medicine*. **26**: 313-327.

Baliga MS, Jagetia GC, Rao SK & Babu K (2003) Evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain spices in vitro: A preliminary study. *Nahrung/Food*. **47**: 261–264.

Barsanti L, Gualtieri P (2006) *Algae anatomy, biochemistry and biotechnology*. Taylor and Francis Group. USA.

Bergman RN & Ader M (2000) Free Fatty Acids and Pathogenesis of Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. **11**: 351-356.

Birari RB & Bhutani KK (2007) Pancreatic lipase inhibitors from natural sources: unexplored potential. *Drug Discovery Today*. **12**: 879-889.

Blondeau N, Lipsky RH, Bourourou M, Duncan MW, Gorelick PB & Marini AM (2015) Alpha-Linolenic Acid: An Omega-3 Fatty Acid with Neuroprotective Properties—Ready for Use in the Stroke Clinic? *BioMed Research International*. **2015**: 1-8.

Borges LL, Lúcio TC, Gil ES & Barbosa EF (2011) Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer – Goiânia*. **7**: 1-20.

Brand-Williams W, Cuvelier ME & Berset C (1995) Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. **28**: 25-30.

Cannell RJP, Kellam SJ, Owsianka AM & Walker JM (1987) Microalgae and Cyanobacteria as a Source of Glycosidase Inhibitors. *Journal of General Microbiology*. **133**: 1701-1705.

Cardozo KHM, Guarantini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, P. Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P & Pinto E (2007) Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **146**: 60-78.

Ceriello A & Motz E (2004) Is Oxidative Stress the Pathogenic Mechanism Underlying Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease? The Common Soil Hypothesis Revisited. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. **24**: 816-823.

Chiba S (1997) Molecular Mechanism in α -Glucosidase and Glucoamylase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **61**: 1233-1239.

Cnop M, Landchild MJ, Vidal J, Havel PJ, Knowles NG, Carr DR, Wang F, Hull RL, Boyko EJ, Retzlaff BM, Walden CE, Knopp RH & Kahn SE (2002) The Concurrent Accumulation of Intra-Abdominal and Subcutaneous Fat Explains the Association Between Insulin Resistance and Plasma Leptin Concentrations. *Diabetes*. **51**: 1005-1015.

Coneski PN & Schoenfisch MH (2012) Nitric oxide release: Part III. Measurement and reporting. *Chemical Society Reviews*. **41**: 3753–3758.

Custódio L, Soares F, Pereira H, Barreira L, Vizetto-Duarte C, Rodrigues MJ, Rauter AP, Alberício F & Varela J (2014) Fatty acid composition and biological activities of *Isochrysis galbana* T-ISO, *Tetraselmis* sp. and *Scenedesmus* sp.: possible application in the pharmaceutical and functional food industries. *Journal of Applied Phycology*. **26**: 151-156.

Daranas AH, Norte M & Fernández JJ (2001) Toxic marine microalgae. *Toxicon*. **39**: 1101-1132.

Davis DL & Nielson MT (1999) Tobacco: Production, Chemistry and Technology, Wiley. USA. *Journal of General Microbiology*. **133**: 1701-1705.

DaYong S, Feng X, Juan H, Jing L, Xiao F, LiJun H (2008) Inhibition of bromophenols against PTP1B and anti-hyperglycemic effect of *Rhodomela confervoides* extract in diabetic rats. *Chinese Science Bulletin*. **53**: 2476-2479.

Derner RB, Ohse S, Villela M, Carvalho SM & Fett R (2006) Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*. **6**: 1959-1967.

Drong AW, Lindgren CM & McCarthy MI (2012) The Genetic and Epigenetic Basis of Type 2 Diabetes and Obesity. *Clinical pharmacology & Therapeutics*. **92**: 707-715.

Elmazar MM, El-Abhar HS, Schaalán MF & Farag NA (2013) Phytol/Phytanic Acid and Insulin Resistance: Potential Role of Phytanic Acid Proven by Docking Simulation and Modulation of Biochemical Alterations. *PLOS ONE*. **8**: 1-10.

Ferreira ALA & Matsubara LS (1997) Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*. **43**: 61-68.

Garcia-Moscoso JL, Teymourí A & Kumar S (2015) Kinetics of Peptides and Arginine Production from Microalgae (*Scenedesmus* sp.) by Flash Hydrolysis. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. **54**: 2048-2058.

Garrick MD, Núñez MT, Olivares M & Harris ED (2003) Parallels and contrasts between iron and copper metabolism. *BioMetals*. **16**: 1-8.

Giacco F & Brownlee (2010) Oxidative Stress and Diabetic Complications. *Circulation Research*. **107**: 1058-1070.

Güven KC, Percot A & Sezik E (2010) Alkaloids in Marine Algae. *Marine Drugs*. **8**: 269-284.

Harada H, Yamashita U, Kurihara H, Fukushi E, Kawabata J & Kamei Y (2002) Antitumor activity of palmitic acid found as a selective cytotoxic substance in a marine red alga. *Anticancer Research*. **22**: 2587-2590.

Heck AM, Yanovski JA & Calis KA (2000) Orlistat, a New Lipase Inhibitor for the Management of Obesity. *Pharmacotherapy*. **20**: 270-279.

Heo SJ, Hwang JY, Choi JI, Han JS, Kim HJ & Jeon YJ (2009) Diphlorethohydroxycarmalol isolated from *Ishige okamurae*, a brown algae, a potent α -glucosidase and α -amylase inhibitor, alleviates postprandial hyperglycemia in diabetic mice. *European Journal of Pharmacology*. **615**: 252-256.

Hou W, Wu W, Yang C, Chen H, Liu S, & Lin Y (2004) Antioxidant activities of leaf extracts of *Liriope spicata* L. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. **45**: 285-290.

Hussain SR, Cillar J & Cillard P (1987) Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*. **26**: 2489-2491.

Jena J, Nayak M, Panda HS, Pradhan N, Sarika C, Panda PK, Rao BVSK, Prasad RBN & Sukla LB (2012) Microalgae of Odisha Coast as a Potential Source for Biodiesel Production. *World Environment*. **2**: 11-16.

Kadegowda AKG, Burns TA, Miller MC & Duckett SK (2013) Cis-9, trans-11 conjugated linoleic acid is endogenously synthesized from palmitelaidic (C16:1 trans-9) acid in bovine adipocytes. *Journal of Animal Science*. **91**: 1614-1623.

Kanimozhi D & Bai R (2012) Analysis of Bioactive Components of Ethanolic Extract of *Coriandrum Sativum* L. *International Journal of Research in Pharmacy and Science*. **2**: 97-110.

Khan AR & Awan FR (2014) Metals in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. **13**: 1-6.

Kim & Kang (2005) Screening of Korean medicinal plants for lipase inhibitory activity. *Phytotherapy Research*. **19**: 359-361.

Kim JS, Kwon CS & Son KH (2000) Inhibition of alpha-glucosidase and amylase by luteolin, a flavonoid. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. **64**: 2458-2461.

Kim KT, Rioux LE & Turgeon SL (2014) Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*. **98**: 27-33.

Kim KY, Nguyen TH, Kurihara H & Kim SM (2010) α -Glucosidase Inhibitory Activity of Bromophenol Purified from the Red Alga *Polyopes lancifolia*. *Journal of Food Science*. **5**: 145-150.

Kim SW, Koo BS & Lee DH (2014) A comparative study of bio-oils from pyrolysis of microalgae and oil seed waste in a fluidized bed. *Bioresource Technology*. **162**: 96-102.

Klejduš B, Kopecký J, Benesová L & Vacek J (2009) Solid-phase/supercritical-fluid extraction for liquid chromatography of phenolic compounds in freshwater microalgae and selected cyanobacterial species. *Journal of Chromatography A*. **1216**: 763-771.

Koberg M, Cohen M, Ben-Amotz A & Gedanken A (2011) Bio-diesel production directly from the microalgae biomass of *Nannochloropsis* by microwave and ultrasound radiation. *Bioresource Technology*. **102**: 4265–4269.

Krienitz L & Wirth Manfred (2006) The high content of polyunsaturated fatty acids in *Nannochloropsis limnetica* (Eustigmatophyceae) and its implication for food web interactions, freshwater aquaculture and biotechnology. *Limnologia*. **36**: 204-210.

Kumar S, Narwal S, Kumar V & Prakash O (2011) α -glucosidase inhibitors from plants: A natural approach to treat diabetes. *Pharmacognosy Reviews*. **5**: 19-29.

Kumaran A & Karunakaran RJ (2006) Nitric Oxide Radical Scavenging Active Component from *Phyllanthus emblica* L. *Plant Foods for Human Nutrition*. **61**: 1-5.

Kwon YI, Apostolidis E, Kim YC & Shetty K (2007) Health benefits of traditional corn, beans, and pumpkin: in vitro studies for hyperglycemia and hypertension management. *Journal of Medicinal Food*. **10**: 266-275.

Lakshmanasenthil S, Vinothkumar T, Geetharamani D, Marudhupandi T, Suja G & Sindhu NS (2014) Fucoidan - a novel α -amylase inhibitor from *Turbinaria ornata* with relevance to NIDDM therapy. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. **3**: 66-70.

Layam A & Reddy CLK (2006) Antidiabetic property of Spirulina. *Diabetologia Croatica*. **35**: 29-33.

Lee SH, Li Y, Karadeniz F, Kim MM & Kim SK (2009) α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of phloroglucinal derivatives from edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **89**: 1552-1558.

- Li Y, Wen S, Kota BP, Peng G, Li GQ, Yamahara J & Roufogalis BD (2005) *Punica granatum* flower extract, a potent α -glucosidase inhibitor, improves postprandial hyperglycemia in Zucker diabetic fatty rats. *Journal of Ethnopharmacology*. **99**: 239-244.
- Lin AHM, Lee BH & Chang WJ (2015) Small intestine mucosal α -glucosidase: A missing feature of in vitro starch digestibility. *Food Hydrocolloids*. **30**: 1-9.
- Lordan S, Smyth TJ, Vila SA, Stanton C & Ross RP (2013) The α -amylase and α -glucosidase inhibitory effects of Irish seaweed extracts. *Food Chemistry*. **141**: 2170-2176.
- Lürling M (2003) Phenotypic plasticity in the green algae *Desmodesmus* and *Scenedesmus* with special reference to the induction of defensive morphology. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*. **39**: 85-101.
- Martysiak-Żurowska D & Wenta W (2012) A comparison of ABTS and DPPH methods for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*. **11**: 83-89.
- Mata TM, Melo AC, Meireles S, Mendes AM, Martins AA & Caetano NS (2013) Potential of Microalgae *Scenedesmus obliquus* Grown in Brewery Wastewater for Biodiesel Production. *The Italian Association of Chemical Engineering*. **32**: 901-906.
- Megías C, Pastor-Cavada E, Torres-Fuentes C, Girón-Calle J, Alaiz M, Juan R, Pastor J & Vioque J (2009) Chelating, antioxidant and antiproliferative activity of *Vicia sativa* polyphenol extracts. *European Food Research and Technology*. **230**: 353-359.
- Mello VD & Laaksonen DE (2009) Dietary fibers: current trends and health benefits in the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. **53**: 509-518.
- Moraes J, Oliveira RN, Costa JP, Junior ALG, Sousa DP, Freitas RM, Allegretti SM & Pinto PLS (2014) Phytol, a Diterpene Alcohol from Chlorophyll, as a Drug against Neglected Tropical Disease Schistosomiasis Mansoni. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. **8**: 1-12.
- Morais MG, Vaz BS, Morais EG & Costa JAV (2015) Biologically Active Metabolites Synthesized by Microalgae. *BioMed Research International*. **2015**: 1-15.
- Narayan KMV, Imperatore G, Benjamin SM & Engelgau MM (2002). Targeting people with pre-diabetes. *BMJ*. **325**: 403-404.
- Natrah FMI, Yusoff FM, Shariff M, Abas F & Mariana NS (2007) Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *Journal of Applied Physiology*. **19**: 711-718.
- Nettleton JA (1995) *Omega-3 Fatty Acids and Health*, Springer.

Pacher P, Beckman JS & Liaudet L (2007) Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*. **87**: 315-424.

Pan A, Chen M, Chowdhury R, Wu JHY, Sun Q, Campos H, Mozaffarian D & Hu FB (2012) α -Linolenic acid and risk of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **96**: 1262-1273.

Pandey KB & Rizvi SI (2009) Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. **2**: 270-278.

Parmeggiani F, Romano MR, Costagliola C, Semeraro F, Incorvaia C, D'Angelo S, Perri P, De Palma P, De Nadai K & Sebastiani A (2012) Mechanism of Inflammation in Age-Related Macular Degeneration. *Mediators of Inflammation*. **2012**: 1-16.

Parul R, Kundu SK & Saha P (2012) In vitro nitric oxide scavenging activity of methanol extracts of three Bangladeshi medicinal plants. *The pharma innovation*. **1**: 83-88.

Pejin B, Sokovic M, Glamoclija J, Ciric A, Nikolic M, Radotic K & Mojovic M (2014) Further in vitro evaluation of antiradical and antimicrobial activities of phytol. *Natural Product Research*. **28**: 372-376.

Perez RM, Zavala MA, Perez S & Perez C (1998) Antidiabetic effect of compounds isolated from plants. *Phytomedicin*. **5**: 55-75.

Plaza M, Herrero M, Cifuentes A & Ibáñez E (2009) Innovative Natural Functional Ingredients from Microalgae. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **57**: 7159-7170.

Prakash O & Jaiswal N (2010) α -Amylase: An Ideal Representative of Thermostable Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. **160**: 2401-2414.

Priyadarshani I & Rath B (2012) Commercial and industrial applications of microalgae – A review. *Journal of Algal Biomass Utilization*. **3**: 89-100.

Pulz O & Gross W (2004) Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **65**: 635-648.

Raposo MFJ, Morais RMSC & Morais AMMB (2013) Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*. **93**: 479-486.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M & Rice-Evans C (1999) Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. **26**: 1231-1237.

Rustan AC & Drevon CA (2005) *Fatty Acids: Structures and Properties*, Encyclopedia of Life Sciences. Oslo.

Sales PM, Souza PM, Simeoni LA, Magalhães PO & Silveira D (2012) α -Amylase Inhibitors: A Review of Raw Material and Isolated Compounds from Plant Source. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. **15**: 141-183.

Santos MH, Batista BL, Duarte SMS, Abreu CMP & Gouvêa CMCP (2007) Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade antioxidante do café (*Coffea arabica*). *Química Nova*. **30**: 604-610.

Shai LJ, Magano SR, Lebelo SL & Mogale AM (2011) Inhibitory effects of five medicinal plants on rat alpha-glucosidase: Comparison with their effects on yeast alpha-glucosidase. *Journal of Medicinal Plants Research*. **5**: 2863-2867.

Shaikh S, Aaqil H, Mohd S, Rizvi D, Shakil S, Abuzenadah AM, Gupta P, Saxena S, Tiwari RK & Kumar A (2015) Comparative Inhibition Study of Compounds Identified in the Methanolic Extract of *Apamarga Kshara* Against *Trichomonas vaginalis* Carbamate Kinase (TvCK): An Enzoinformatics Approach. *Interdisciplinary Sciences: Computational Life Sciences*. 1-9.

Striegel L, Kang B, Pilkenton SJ, Rychlik M & Apostolidis E (2015) Effect of black tea and black tea pomace polyphenols on α -glucosidase and α -amylase inhibition, relevant to type 2 diabetes prevention. *Frontiers in Nutrition*. **2**: 1-6.

Su CH, Hsu CH & Ng LT (2013) Inhibitory potential of fatty acids on key enzymes related to type 2 diabetes. *BioFactors*. **39**: 415-421.

Swanson D, Block R & Mousa SA (2012) Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances in Nutrition*. **3**: 1-7.

Tadera K, Minami Y, Takamatsu K & Matsuoka T (2006) Inhibition of α -Glucosidase and α -Amylase by Flavonoids. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. **52**: 149-153.

Tatsch E, Bochi GV, Pereira RS, Kober H, Oliveira JR & Moresco RN (2011) Influência dos anticoagulantes e da temperatura de armazenamento sobre os níveis sanguíneos de nitrito. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. **47**: 147-150.

Texeira J, Gaspar A, Garrido EM, Garrido J & Borges F (2013) Hydroxycinnamic acid antioxidants: An electrochemical overview. *BioMed Research International*. **2013**: 1-11.

Touchstone JC (1983) *Practice of thin layer chromatography*, Wiley, 2nd edition. New York.

Van de Laar FA (2008) Alpha-glucosidase inhibitors in the early treatment of type 2 diabetes. *Vascular Health and Risk Management*. **4**: 1189-1195.

Vozlyan PA & Yazlovitskaya EM (2014) Reactive Oxygen Species. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*. **6**: 1-3.

Weickert MO & Pfeiffer AFH (2008) Metabolic Effects of Dietary Fiber Consumption and Prevention of Diabetes. *The Journal of Nutrition*. **138**: 439-442.

Wu YB, Zheng LJ, Wu JG, Chen TQ, Yi J & Wu JZ (2012) Antioxidant Activities of Extract and Fractions from Receptaculum Nelumbinis and Related Flavonol Glycosides. *International Journal of Molecular Sciences*. **13**: 7163-7173.

Xiao Z, Storms R & Tsang A (2006) A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*. **351**: 146-148.