



**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA



**Avaliação da Actividade Biológica de Extractos de Diferentes  
Espécies de Microalgas**

Mestrado em Biologia Marinha  
Especialização em Biotecnologia Marinha

**Fernando José Afonso Sentinha Soares**

Setembro de 2011





**UNIVERSIDADE DO ALGARVE**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**



**AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRACTOS DE  
DIFERENTES ESPÉCIES DE MICROALGAS**

Mestrado em Biologia Marinha  
Especialização em Biotecnologia Marinha

**Fernando José Afonso Sentinha Soares**

Dissertação Orientada por:  
Professor Doutor João Carlos Serafim Varela  
Doutora Luísa Margarida Batista Custódio

Setembro de 2011



*"A natureza é o único livro que oferece um conteúdo valioso em todas as suas folhas"*

*Goethe*

*Às pessoas muito especiais:*

*José António Soares, Maria do Monte Sentinha Soares, Joaquim José Sentinha Soares,*

*Elizabeth Cotta Évora, Celie Vânia Brito Soares e Elizandro Évora Soares,*

*que sempre estiveram e continuam do meu lado,*

*partilhando o mesmo sentido de interajuda*

*e que continuam a acreditar que a vida é feita de conquistas.*

O conteúdo deste relatório é da exclusiva responsabilidade do autor:

---

Fernando José Afonso Sentinha Soares

## 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) e pela orientação durante todo este período.

À Doutora Luísa Custódio (MarBiotech, CCMAR) pela orientação, sugestões, críticas e simplicidade na forma como transmite os conhecimentos.

À Catarina Duarte (MarBiotech, CCMAR) pelo apoio na aprendizagem de aplicação das técnicas de cultivo de linhas celulares, orientação na análise e interpretação dos resultados.

Ao Hugo Pereira (MarBiotech, CCMAR) pela sua pronta disponibilidade, orientação na análise e tratamento estatísticos dos dados e demais auxílios prestados.

À Professora Doutora Ana Barbosa e Sr.<sup>a</sup> Carla Reis pelo apoio prestado na fase de formulação do processo de candidatura. À Professora Doutora Margarida Castro pelo apoio crucial prestado no momento certo.

À Laura, Maria João, Maria Isabel, Mafalda Pereira e Dinis pela partilha de experiências e conhecimentos na aplicação dos métodos biotecnológicos. À Cristina, João Palma, Nuno, Pabla Ugalde pelo apoio durante a realização desta tese.

Às Sr.<sup>as</sup> Joana Virgínia Maria e Maria de Fátima, e o Sr. David Pinto Jesus pela forma como me têm apoiado, contribuindo para que esse projecto tornasse uma realidade.

Ao Jandir dos Reis pela amizade e prestigiosa contribuição na concretização deste trabalho. Estamos distantes, mas sempre juntos!

Ao Evandro Lopes, Samir Martins, Aricson Delgado e Denise Neves pela convivência e participação na concretização de mais um objectivo.

Ao Luís Amaro Monteiro Silva (ADEVIC-São Vicente) pelo apoio na aquisição de meios necessários para a obtenção de um bilhete no voo Cabo Verde/ Portugal.

À Lucinda Soares pelo apoio que me tem prestado e amizade incondicional. Ao meu primo Ajerson Soares pela companhia, amizade e partilha de bons momentos.

Aos meus familiares, em particular a todos os meus irmãos pela motivação que me têm transmitido.

Ao Leinine Correia, Adilson Gonçalves, Tiago Mourinho, Marcos Silva e José dos Santos pela partilha de momentos agradáveis. Ao Jackson Pachito pelo apoio prestado. À Cíntia Gonçalves e Simone Silva pela amizade e sentido de encorajamento durante a realização da minha tese.

Ao Sr. Pedro Cebola (CASA) pela colaboração no fornecimento de apoios necessários, garantindo assim boas condições de acolhimento.

A todos aqueles que contribuíram para que este projecto se materializasse como mais um desafio cumprido, um Obrigado Muito Especial!

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>ACRÓNIMOS</b> .....	<b>xvi</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xviii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>2</b>
<b>1.1. MICROALGAS</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2. CARACTERIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE MICROALGAS</b> .....	<b>2</b>
<b>1.3. ESPÉCIES DE MICROALGAS UTILIZADAS</b> .....	<b>4</b>
<b>1.4. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E STRESS OXIDATIVO</b> .....	<b>6</b>
<b>1.5. CANCRO</b> .....	<b>7</b>
<b>1.6. NEUROPROTECÇÃO</b> .....	<b>9</b>
1.6.1. ACETILCOLINA (ACh) E ACETILCOLINESTERASE (AChE) .....	9
1.6.2. METAIS PESADOS: FERRO (Fe <sup>2+</sup> ) E COBRE (Cu <sup>2+</sup> ) .....	10
<b>1.7. FONTES DE COMPOSTOS BIOACTIVOS</b> .....	<b>11</b>
1.7.1. COMPOSTOS BIOACTIVOS DE ORGANISMOS MARINHOS .....	11
1.7.2. BIOCÓMPUESTOS ISOLADOS A PARTIR DE MICROALGAS .....	14
<b>1.8. OBJECTIVOS</b> .....	<b>14</b>
1.8.1. OBJECTIVO GERAL .....	15
1.8.2. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>2. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS</b> .....	<b>16</b>
<b>2.2. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE</b> .....	<b>16</b>
2.2.1. MÉTODO DE 1,1-DIFENIL-2-PICRIHIDRAZIL (DPPH) .....	16
2.2.2. MÉTODO DE TEAC ( <i>TROLOX EQUIVALENTS ANTIOXIDANT CAPACITY</i> ) .....	17
<b>2.3. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i></b> .....	<b>18</b>
2.3.1. CULTURA E MANUTENÇÃO DAS LINHAS CELULARES .....	18
2.3.2. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR .....	19
2.3.3. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELECTIVIDADE DOS EXTRACTOS .....	20
<b>2.4. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE NEUROPROTECTORA</b> .....	<b>20</b>
2.4.1. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE INIBITÓRIA DA AChE .....	20
2.4.2. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE QUELANTE .....	21
<b>2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>21</b>
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>22</b>

<b>3.1.</b>	<b>RENDIMENTO DE EXTRACÇÃO DA BIOMASSA ALGAL</b>	<b>22</b>
<b>3.2.</b>	<b>ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE</b>	<b>23</b>
3.2.1.	MÉTODO DE DPPH	23
3.2.2.	MÉTODO DE ABTS	26
<b>3.3.</b>	<b>ACTIVIDADE ANTITUMORAL</b>	<b>29</b>
3.3.1.	MÉTODO DO MTT	29
<b>3.4.</b>	<b>ACTIVIDADE NEUROPROTECTORA</b>	<b>34</b>
3.4.1.	ACTIVIDADE INIBITÓRIA DA AChE	34
3.4.2.	ACTIVIDADE QUELANTE DE $Fe^{2+}$	38
3.4.3.	ACTIVIDADE QUELANTE DE $Cu^{2+}$	42
<b>4.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>46</b>
<b>4.1.</b>	<b>ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE</b>	<b>46</b>
<b>4.2.</b>	<b>ACTIVIDADE ANTITUMORAL</b>	<b>47</b>
<b>4.3.</b>	<b>ACTIVIDADE NEUROPROTECTORA</b>	<b>49</b>
4.3.1.	ACTIVIDADE INIBITÓRIA DA AChE	49
4.3.2.	ACTIVIDADE QUELANTE ( $Fe^{2+}$ E $Cu^{2+}$ )	50
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>PERSPECTIVAS FUTURAS</b>	<b>54</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>55</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Actividades biológicas e compostos bioactivos isolados de diversos organismos marinhos.....	13
<b>Tabela 2.</b> Actividades biológicas e biocompostos isolados a partir de microalgas. ....	14
<b>Tabela 3.</b> Rendimento (%) da extracção de diferentes espécies de microalgas.....	22
<b>Tabela 4.</b> Actividade antioxidante determinada através do método de DPPH (IC <sub>50</sub> , mg/mL) de diferentes extractos de espécies de microalgas.....	26
<b>Tabela 5.</b> Valores de IC <sub>50</sub> (µg/mL) dos extractos com actividade antitumoral de diferentes espécies de microalgas, aplicados em duas linhas celulares humanas. .	31
<b>Tabela 6.</b> Actividade inibitória da AChE (IC <sub>50</sub> , mg/mL) dos diferentes extractos de microalgas.....	38
<b>Tabela 7.</b> Actividade quelante de Fe <sup>2+</sup> (IC <sub>50</sub> , mg/mL) dos diferentes extractos de microalgas.....	41
<b>Tabela 8.</b> Actividade quelante de Cu <sup>2+</sup> (IC <sub>50</sub> , mg/mL) de diferentes extractos de microalgas.....	45
<b>Tabela 9.</b> Extractos mais bioactivos das diferentes espécies de microalgas analisadas. ..	45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Foto ilustrativa das diferentes espécies de microalgas usadas neste estudo.....	6
<b>Figura 2.</b> Processo de carcinogénese. Adaptado de Oliveira <i>et al.</i> (2007)..	8
<b>Figura 3.</b> Mecanismo de acção da acetilcolinesterase (AChE).....	10
<b>Figura 4.</b> Estabilização/Redução do radical DPPH <sup>·</sup> na presença de compostos antioxidantes.....	17
<b>Figura 5.</b> Fotos ilustrativas das linhas celulares. A: Células do estroma de medula óssea (S17). B: Células humanas de hepatocarcinoma (HepG2).....	18
<b>Figura 6.1.</b> Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga <i>B. braunii</i> , determinada através do método de DPPH.....	23
<b>Figura 7.2.</b> Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga <i>I. galbana</i> T-ISO, determinada através do método de DPPH.....	24
<b>Figura 8.3.</b> Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga <i>N. oculata</i> , determinada através do método de DPPH.....	24
<b>Figura 9.4.</b> Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga <i>Tetraselmis sp.</i> , determinada através do método de DPPH. ....	25
<b>Figura 10.5.</b> Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> , determinada através do método de DPPH. ....	25
<b>Figura 11.1.</b> Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga <i>B. braunii</i> , determinada através do método de ABTS.....	27
<b>Figura 12.2.</b> Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga <i>I. galbana</i> T-ISO, determinada através do método de ABTS.....	27
<b>Figura 13.3.</b> Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga <i>N. oculata</i> , determinada através do método de ABTS.....	28
<b>Figura 14.4.</b> Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga <i>Tetraselmis sp.</i> , determinada através do método de ABTS.....	28
<b>Figura 15.5.</b> Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> , determinada através do método de ABTS..	29
<b>Figura 16.1.</b> Efeito da aplicação de diferentes extractos de microalgas e viabilidade celular da linha celular tumoral, HepG2... ..	30
<b>Figura 17.2.</b> Viabilidade celular (%; barras) e IS (linha) do extracto de hexano para a espécie <i>Tetraselmis sp.</i> .....	32

<b>Figura 18.3.</b> Viabilidade celular (%; barras) e IS (linha) do extracto de hexano para a espécie <i>Scenedesmus sp.</i> .....	32
<b>Figura 19.4.</b> Viabilidade celular (%; barras) e IS (linha) do extracto de éter para a espécie <i>I. galbana</i> T-ISO. ....	33
<b>Figura 20.5.</b> Viabilidade celular (%; barras) e IS (linha) do extracto de acetona para a espécie <i>I. galbana</i> T-ISO. ....	34
<b>Figura 21.1.</b> Actividade inibitória da AChE (%) dos diferentes extractos da microalga <i>B. braunii</i> . ....	35
<b>Figura 22.2.</b> Actividade inibitória da AChE (%) dos diferentes extractos da microalga <i>I. galbana</i> T-ISO. ....	35
<b>Figura 23.3.</b> Actividade inibitória da AChE (%) dos diferentes extractos da microalga <i>N. oculata</i> . ....	36
<b>Figura 24.4.</b> Actividade inibitória da AChE (%) dos diferentes extractos da microalga <i>Tetraselmis sp.</i> .....	37
<b>Figura 25.5.</b> Actividade inibitória da AChE (%) dos diferentes extractos da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> .....	37
<b>Figura 26.1.</b> Actividade quelante (%) de Fe <sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga <i>B. braunii</i> . ....	39
<b>Figura 27.2.</b> Actividade quelante (%) de Fe <sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga <i>I. galbana</i> T-ISO. ....	39
<b>Figura 28.3.</b> Actividade quelante (%) de Fe <sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga <i>N. oculata</i> . ....	40
<b>Figura 29.4.</b> Actividade quelante (%) de Fe <sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga <i>Tetraselmis sp.</i> .....	40
<b>Figura 30.5.</b> Actividade quelante (%) de Fe <sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga <i>Scenedesmus sp.</i> .....	41
<b>Figura 31.1.</b> Actividade quelante (%) de Cu <sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga <i>B. braunii</i> . ....	42
<b>Figura 32.2.</b> Actividade quelante (%) de Cu <sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga <i>I. galbana</i> T-ISO. ....	43
<b>Figura 33.3.</b> Actividade quelante (%) de Cu <sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga <i>N. oculata</i> . ....	43
<b>Figura 34.4.</b> Actividade quelante (%) de Cu <sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga <i>Tetraselmis sp.</i> .....	44

**Figura 35.5.** Actividade quelante (%) de  $\text{Cu}^{2+}$  dos diferentes extractos da microalga  
*Scenedesmus sp.* ..... 44

## ACRÓNIMOS

<b>ABTS<sup>+</sup></b>	Ácido 2,2'-azino- <i>bis</i> -(3-etilbenzotiacolina-6-sulfónico)
<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>AChE</b>	Acetilcolinesterase
<b>AD</b>	Doença de Alzheimer (do inglês, <i>Alzheimer disease</i> )
<b>BHT</b>	Butil-hidroxitolueno
<b>CBME</b>	Centro de Biomedicina Molecular e Estrutural
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dióxido de carbono
<b>DHA</b>	Ácido docosahexenóico
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
<b>DPPH<sup>·</sup></b>	1,1-difenil-2-picrihidrazilo
<b>DTNB</b>	Ácido 5,5-Dithio- <i>bis</i> (2-nitrobenzóico)
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetra-acético
<b>EP</b>	Erro padrão
<b>EPA</b>	Ácido eicosapentenóico
<b>EUA</b>	Estados Unidos da América
<b>HIV</b>	Vírus da imunodeficiência humana
<b>IP</b>	Índice de polaridade
<b>IS</b>	Índice de selectividade
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-di-metilazolo-2-il)-2,5-difenilo-tetrazólio
<b>PV</b>	Pirocatecol violeta
<b>PD</b>	Doença de Parkinson (do inglês, <i>Parkinson disease</i> )
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SNP</b>	Sistema nervoso periférico
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>TEAC</b>	<i>Trolox Equivalents Antioxidant Capacity</i>
<b>TFP</b>	Tampão fosfato potássico

## RESUMO

A nossa sociedade enfrenta diversas dificuldades devido ao aparecimento e/ou agravamento de várias doenças ao longo do tempo, o que conduz à crescente necessidade de pesquisa de novos compostos biológicos de origem natural com aplicações biomédicas. As microalgas são reconhecidas como uma potencial fonte de produtos com interesse comercial para a aquacultura, indústria farmacêutica e cosmética. Neste contexto, este estudo teve como objectivo avaliar a actividade biológica de diferentes extractos de espécies de microalgas (*Botryococcus braunii*, *Isochrysis galbana* T-ISO, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis sp.* e *Scenedesmus sp.*), nomeadamente actividade antioxidante (DPPH e ABTS), actividade antitumoral (MTT) *in vitro* na linha celular tumoral do hepatocarcinoma humano HepG2, actividade neuroprotectora através da avaliação da capacidade inibitória da enzima AChE e a actividade quelante do Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>. O extracto de acetona da espécie *I. galbana* T-ISO apresentou maior actividade antioxidante segundo o método de DPPH (IC<sub>50</sub>=1,90 mg/mL). As espécies com maior impacto ao nível da redução da viabilidade celular da linha tumoral HepG2 foram as seguintes: *I. galbana* T-ISO (acetona: IC<sub>50</sub>=81,3 µg/mL; IS=3,15; éter: IC<sub>50</sub>=114,03 µg/mL; IS=2,06), *Tetraselmis sp.* (hexano; IC<sub>50</sub>=58,25 µg/mL; IS=1,48) e *Scenedesmus sp.* (hexano; IC<sub>50</sub>=93,17 µg/mL; IS=1,10). O extracto de acetona da espécie *B. braunii* apresentou a maior actividade inibitória da AChE (IC<sub>50</sub>= 0,05 mg/mL). Os extractos de hexano das espécies *N. oculata* (IC<sub>50</sub>= 0,70 mg/mL) e *Scenedesmus sp.* (IC<sub>50</sub>= 0,73 mg/mL) apresentaram os valores mais elevados de actividade quelante contra o Fe<sup>2+</sup>. Por outro lado, os extractos de hexano das espécies *I. galbana* T-ISO (IC<sub>50</sub> = 0,90 mg/mL) e *Scenedesmus sp.* (IC<sub>50</sub> = 0,91 mg/mL) apresentaram os valores mais elevados de actividade quelante contra o Cu<sup>2+</sup>. A *I. galbana* T-ISO revelou ser a espécie mais promissora em termos de compostos com actividades biológicas, portanto será importante avaliar que tipos de compostos são responsáveis por esta elevada bioactividade em estudos futuros.

**Palavras-chave:** antitumoral; antioxidantes; DPPH; microalgas; neuroprotecção.

## ABSTRACT

Our society faces many difficulties due to the appearance and/or exacerbation of various diseases over time, leading to increased need for research of new biological compounds of natural origin with biomedical applications. Microalgae are recognized as a potential source of products of commercial interest for aquaculture, pharmaceutical and cosmetic industries. In this context, this study aimed to assess the biological activity of different extracts of species of microalgae (*Botryococcus braunii*, *Isochrysis galbana* T-ISO, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis sp.* and *Scenedesmus sp.*), including antioxidant activity (DPPH and ABTS), antitumor activity (MTT) *in vitro* in the tumor cell line human hepatocarcinoma HepG2, neuroprotective activity by assessing the ability of extract to inhibit the enzyme AChE and chelate  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$ . The acetone extract of the species *I. galbana* T-ISO showed greater antioxidant activity by the method of DPPH ( $\text{IC}_{50}$ = 1.90 mg/mL). The species with the greatest impact in reducing the viability of HepG2 tumor cell line were as follows: *I. galbana* T-ISO (acetone:  $\text{IC}_{50}$ = 81.3  $\mu\text{g/mL}$ , IS= 3.15, ether:  $\text{IC}_{50}$ = 114.03  $\mu\text{g/mL}$ , IS= 2.06), *Tetraselmis sp.* (hexane  $\text{IC}_{50}$ = 58.25  $\mu\text{g/mL}$ , IS = 1.48) and *Scenedesmus sp.* (hexane  $\text{IC}_{50}$ = 93.17  $\mu\text{g/mL}$ : IS= 1.10). The acetone extract of the species *B. braunii* had the highest AChE inhibitory activity ( $\text{IC}_{50}$ = 0.05 mg/mL). The hexane extracts of the species *N. oculata* ( $\text{IC}_{50}$ = 0.70 mg/mL) and *Scenedesmus sp.* ( $\text{IC}_{50}$ = 0.73 mg/mL) had the highest values of activity as  $\text{Fe}^{2+}$  chelator. On the other hand, the hexane extracts of the species *I. galbana* T-ISO ( $\text{IC}_{50}$ = 0.90 mg/mL) and *Scenedesmus sp.* ( $\text{IC}_{50}$ = 0.91 mg/mL) had the highest values of activity as  $\text{Cu}^{2+}$  chelator. *I. galbana* T-ISO proved to be the most promising species in terms of compounds with biological activity, so it will be important to assess what types of compounds are responsible for this high bioactivity in future work.

**Key words:** antitumoral; antioxidants; DPPH; microalgae; neuroprotection.



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. MICROALGAS

As microalgas são organismos microscópicos fotossintéticos que apresentam uma biodiversidade muito elevada como resultado da sua grande capacidade de adaptação a habitats variados, alguns dos quais ambientes extremos (Cardozo *et al.*, 2007; Wijffels, 2007). Elas constituem um grupo heterogéneo de organismos unicelulares, coloniais ou filamentosas, com diversos padrões de coloração, devido aos seus pigmentos fotossintéticos (Olaizola, 2003). No entanto, podem desenvolver-se em ambiente marinho, de água doce e ainda incrustados no solo (Chisti, 2004).

As microalgas podem ser organismos procariotas ou eucariotas (Hoek *et al.*, 1995; McHugh, 2003): as procariotas pertencem ao grupo das *Cyanophyta* (cianobactérias) e *Prochlorophyta*; as eucariotas estão incluídas principalmente nas classes, *Bacillariophyceae* (diatomáceas), *Dinophyceae* (dinoflagelados), *Prymnesiophyceae* (cocolitoforídeos) e *Cryptophyceae* (criptomonas), para além das *Prasinophyceae* e *Chlorophyceae*. Todos estes organismos juntamente com as macroalgas constituem um total de 25 a 30.000 espécies, podendo assim apresentar elevada diversidade de formas e tamanhos (Plaza *et al.*, 2008).

### 1.2. CARACTERIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE MICROALGAS

A produção de microalgas para aplicações biotecnológicas tem crescido significativamente nos últimos anos. Este aumento deve-se principalmente às características particulares e elevada biodiversidade associada a estes microrganismos (Pulz e Gross, 2004).

Muitas espécies de microalgas têm sido amplamente comercializadas e utilizadas como suplementos nutricionais, com o intuito de aumentar o valor nutricional dos alimentos e da ração animal, devido à sua composição bioquímica bem equilibrada (Gouveia *et al.*, 2008), particularmente pela capacidade de produzirem ácidos gordos polinsaturados (PUFAs) de cadeia longa, constituídos principalmente pelo ácido eicosapenténico (EPA, 20:5  $\omega$ 3) e o ácido docosahexenóico (DHA, 22:6  $\omega$ 3). Todavia, a produção de microalgas destina-se maioritariamente para a criação comercial em aquacultura de muitos animais aquáticos, principalmente nas fases larvares e juvenis de moluscos, crustáceos, peixes e zooplâncton (Fidalgo *et al.*, 1998). Muitas espécies aquáticas como salmão, truta, lagosta

dourada e carpa necessitam de suplementos de carotenóides para garantirem a coloração muscular característica (Baker e Gunther, 2004).

As microalgas constituem ainda uma fonte biológica promissora de novos compostos bioactivos (Pulz e Gross, 2004). Uma vez que têm a capacidade de sintetizar, metabolizar, acumular e secretar uma grande diversidade de metabolitos primários e secundários, muitos dos quais substâncias valiosas, com potenciais aplicações na indústria alimentar, farmacêutica e cosmética (Yamaguchi, 1997; Cardozo *et al.*, 2007; Wijffels, 2007). Sendo assim, podem ser usadas como suplementos nutricionais, inseridas nos alimentos, devido ao seu elevado conteúdo em ácidos gordos polinsaturados, sendo variados os benefícios associados ao seu consumo (Becker, 1994).

Para além das clorofilas como pigmentos fotossintéticos primários, as microalgas também são constituídas por pigmentos secundários, tais como ficobiliproteínas e uma grande variedade de carotenóides (Ferruzi e Blakeslee, 2007). Os pigmentos carotenóides, como por exemplo a astaxantina,  $\beta$ -caroteno, e luteína, são usados na indústria farmacêutica, medicina e alimentação humana, como compostos bioactivos devido às suas propriedades terapêuticas (Derner *et al.*, 2006), provavelmente ligadas à sua actividade antioxidante. No entanto, estes compostos têm sido tradicionalmente usados na medicina devido a sua capacidade na cicatrização de feridas e propriedades antiinflamatórias (Ferruzi e Blakeslee, 2007).

Actualmente as microalgas têm sido vistas com grande potencial como matéria-prima sustentável para a produção de biodiesel em detrimento das plantas superiores (Chisti, 2007). A produção de microalgas constitui ainda um importante mecanismo natural para reduzir o excesso de CO<sub>2</sub> atmosférico por biofixação de carbono em produtos, garantindo assim um menor efeito estufa, redução do aquecimento global e de mudanças climáticas (Gouveia *et al.*, 2008).

Nos últimos anos aumentou igualmente o interesse pelo uso de microalgas para tratamento de águas residuais, uma vez que estas podem ser utilizadas com o objectivo de remover (ou transformar) os poluentes existentes nas águas, como excesso de nutrientes, xenobióticos e metais pesados, podendo a biomassa servir posteriormente para outras aplicações (Carlsson *et al.*, 2007).

### 1.3. ESPÉCIES DE MICROALGAS UTILIZADAS

As espécies de microalgas usadas neste estudo são amplamente usadas em várias aplicações biotecnológicas tais como na aquacultura, medicina, indústria alimentar e na produção de biodiesel, devido as suas composições bioquímicas ricas em compostos biológicos.

#### ***Botryococcus braunii***

Esta espécie pertence ao filo *Chlorophyta* e à classe *Trebouxiophyceae*. Apresenta talos microscópicos de um milímetro de diâmetro, podendo ser de formas esféricas, ovais ou irregulares. A morfologia das células pode ser alongadas, ovóides, cónicas estreitas em direcção ao centro da colónia, ou então esféricas na periferia de colónias. Podem estar dispostas radialmente em uma camada, total ou parcialmente imersas numa matriz central mucilagínosa compacta ou directamente ligadas a ela por suas partes basais (Fig. 1A). Contém células de 6-20 µm de diâmetro e 2,5-8 µm de largura. Apresenta núcleo único, cloroplasto parietal em forma de taça, com um pirenóide basal. A reprodução é assexuada com 2-4-8 (-16) autoesporos (Kützing, 1849).

#### ***Isochrysis galbana***

Esta microalga pertence ao filo *Haptophyta* e à classe *Haptophyceae*. Apresentam células com 5-6 µm de diâmetro com dois flagelos de aproximadamente 7 µm de comprimento (Tomas, 1996). A *I. galbana* é uma microalga rica em ácidos gordos polinsaturados (PUFAs), principalmente o ácido eicosapentenoico (EPA; 20:05 ω3; Gouveia *et al.*, 2008), e triacilgliceróis (Brown *et al.*, 1997, Przeslawski *et al.*, 2008). Esta espécie é usada na alimentação de muitos organismos aquáticos principalmente nas fases larvares e juvenis de moluscos, crustáceos e várias espécies de peixes (Fidalgo *et al.*, 1998). Devido a sua composição bioquímica elevada em ácidos gordos polinsaturados de cadeia ómega-3 são utilizados diferentes níveis de compostos bioactivos isolados desta espécie, incorporados em biscoitos e pastas, sendo assim usada em várias aplicações na indústria alimentar (Gouveia *et al.*, 2008). A distribuição geográfica e abundância desta espécie em águas marinhas são desconhecidas (Fig. 1D). A espécie foi identificada em uma lagoa piscícola na Ilha de Man (Parke, 1941) e é considerada como sendo uma espécie do litoral (Marlowe *et al.*, 1990).

### ***Nannochloropsis oculata***

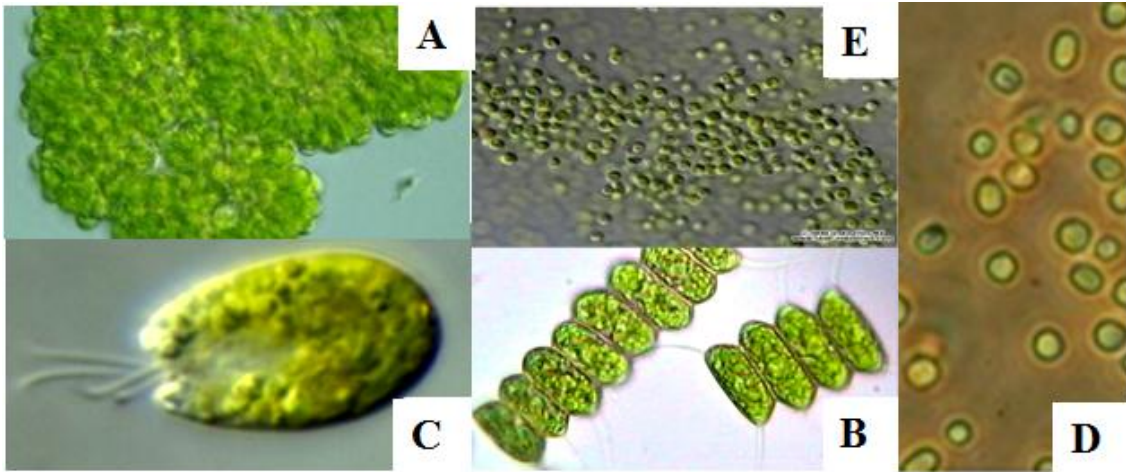
Esta microalga pertence ao filo *Ochrophyta* e à classe *Eustigmatophyceae*. Esta classe contém cerca de seis géneros que foram separados das *Xanthophyceae*. Os eustigmatófitos são organismos unicelulares, flagelados, que vivem em suspensão em águas marinhas ou podem crescer fixas a vários substratos (Fig. 1E). São únicas por se caracterizarem apenas pela presença exclusiva de clorofila *a* (Fisher *et al.*, 1998). As células podem ser subesféricas, medindo entre 2 a 4 µm de diâmetro, ou cilíndricas medindo 3-4 x 1,5 µm. Apresentam uma coloração verde-amarelada no cloroplasto parietal, típica da classe em que estão inseridas. Não produzem zoósporos e a sua divisão celular ocorre por fissão binária (Antia & Cheng, 1982). É usada como fonte de nutrientes em aquacultura devido ao seu grande conteúdo em ácidos gordos polinsaturados (Seiffert *et al.*, 2001).

### ***Tetraselmis sp.***

Esta microalga está incluída no filo *Chlorophyta* e pertence à classe das *Prasinophyceae*. O género *Tetraselmis* é caracterizado por ter uma morfologia elíptica, quase esférica, ligeiramente curva. São organismos unicelulares flagelados, com uma invaginação na extremidade anterior da qual saem quatro flagelos iguais em dois pares opostos (Fig. 1C). A célula contém um único cloroplasto, mais ou menos em forma de taça, geralmente com um pirenóide central. Esta espécie é de água salgada, cuja reprodução ocorre assexuadamente nos estados imóveis. Algumas espécies possuem cistos vegetativos com paredes celulares espessas que germinam por divisão em 4 células (Stein, 1878).

### ***Scenedesmus sp.***

Esta espécie pertence ao filo *Chlorophyta* e à classe *Chlorophyceae*. Os talos podem ser unicelulares ou coloniais, formando 2 a 32 células, normalmente 4 a 8 células designadas de coenobia. Pode apresentar matriz mucilaginosa ou não. As células podem estar dispostas linearmente ou alternadas em 2-3 linhas, junto as paredes laterais ou na região subpolar. A sua morfologia pode variar de formas esféricas a elipsoidais ou alongados a fusiformes (Fig. 1B). A parede celular pode apresentar uma camada de esporopolenina e hemicelulose, geralmente lisa. Apresenta células com um único núcleo e cloroplasto parietal com único pirenóide. A reprodução é assexuada por autoesporos, com 2-32 destes por esporângios, normalmente organizados em forma de um cenóbio ou desintegradas em células simples, e a libertação de esporos ocorre por ruptura da parede celular dos progenitores (Meyen, 1829).



**Figura 1.** Foto ilustrativa das diferentes espécies de microalgas usadas neste estudo. **A:** *B. braunii* ([http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/Chlorophyta/Botryococcus/braunii/sp\\_1c.jpg](http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/Chlorophyta/Botryococcus/braunii/sp_1c.jpg)); **B:** *Scenedesmus sp.* (<http://www.microscopy-uk.org.uk/mag//imgoct05/Scenedesmus-opoliensis.jpg>); **C:** *Tetraselmis sp.* ([http://planktonnet.awi.de/repository/rawdataPlanktonNet2/viewable/fjouenne\\_tetraselmis\\_chui\\_59\\_20070424\\_113121\\_w.jpg](http://planktonnet.awi.de/repository/rawdataPlanktonNet2/viewable/fjouenne_tetraselmis_chui_59_20070424_113121_w.jpg)); **D:** *I. galbana* ([http://www.nhm.ac.uk/hosted\\_sites/ina/CODENET/galleries/DICimages/image/iso.jpg](http://www.nhm.ac.uk/hosted_sites/ina/CODENET/galleries/DICimages/image/iso.jpg)); **E:** *N. oculata* ([http://www.sbae-industries.com/Technology/pics/Nannochloropsis\\_oculata.jpg](http://www.sbae-industries.com/Technology/pics/Nannochloropsis_oculata.jpg)).

#### 1.4. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE E STRESS OXIDATIVO

Os radicais livres de oxigénio, ou mais genericamente espécies reactivas de oxigénio (ROS – *Reactive Oxygen Species*), são produtos resultantes do metabolismo normal das células, os quais estão associados a processos como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (DNA, lípidos, proteínas, glícidos). No entanto, o seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lípidos membranares e a destruição de proteínas estruturais, enzimas, glícidos e ácidos nucleicos (Hussain *et al.*, 1987; Nanji *et al.*, 1994).

O desequilíbrio entre os compostos oxidantes e antioxidantes resulta na formação de radicais livres, que é conhecido como stress oxidativo. Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana celular. Estes radicais são produzidos *in vivo* tais como, o superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) e hipocloreto ( $ClOH$ ) são responsáveis pelo desencadeamento de várias doenças nos organismos (Aruoma e Halliwell, 1987). Porém, os organismos estão dotados de sistemas de defesa, incluindo as enzimas superóxido dismutase, glutathiona peroxidase e a catalase como meios de protecção contra os danos causados por estes radicais livres. Os processos de oxidação podem ser evitados pela mudança das condições ambientais ou através do uso de compostos antioxidantes para prevenir ou reduzir reacções oxidativas. A prática de dietas

ricas em compostos antioxidantes contendo suplementos tais como  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, flavonóides, carotenóides, compostos polifenólicos e glutathione poderão diminuir os riscos de desenvolvimento da maior parte das doenças nos seres humanos (Ferreira e Matsubara, 1997; Barros *et al.*, 2007).

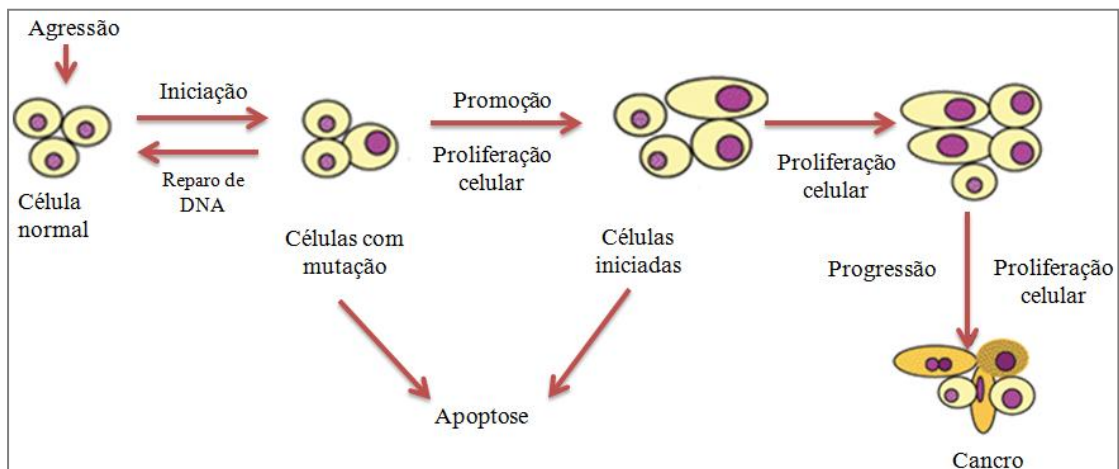
De facto, existe actualmente grande interesse no estudo dos compostos antioxidantes por serem substâncias que em pequenas quantidades podem apresentar alto potencial profilático e terapêutico de doenças causadas por radicais livres (Noguchi e Niki, 2000; Barros *et al.*, 2008; Kil *et al.*, 2009). Dessa forma, os radicais livres encontram-se relacionados com várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças cardíacas, catarata, disfunções cognitivas, envelhecimento e cancro, podendo ser a causa ou o factor agravante destas (Halliwell *et al.*, 1995; Bianchi e Antunes, 1999; Shu e Lung, 2008). Estas observações têm estimulado a investigação de novos compostos bioactivos com potencial antioxidante.

## **1.5. CANCRO**

O cancro é uma doença originada por mutações nos mecanismos de controlo dos processos de proliferação e diferenciação celular (Salmon e Sartorelli, 2003). A célula cancerígena caracteriza-se pela perda de função em consequência da ausência de diferenciação, proliferação incontrolada, invasão de tecidos adjacentes e metástase (Fig. 2). A origem dessa célula provém de alterações genéticas que podem ser produzidas por diversos mecanismos como a inactivação de genes supressores de tumores, activação de oncogenes, inactivação de genes responsáveis pela apoptose e mutações produzidas por agentes químicos, físicos e biológicos (Brentani e Coelho, 1998).

A morte celular pode ocorrer de duas formas distintas: por apoptose e necrose. A apoptose é um mecanismo intrínseco conhecido como morte celular programada e caracterizada pela ausência de inflamação na área envolvente das células mortas. As alterações morfológicas da apoptose resultam da activação de caspases (proteases da cisteína) por libertação de mediadores apoptóticos das mitocôndrias. Por outro lado, a necrose é considerada como uma forma de morte celular passiva e definida como resultado final de danos bioenergéticos resultante da depleção de ATP a um nível incompatível com a

sobrevivência celular, causada principalmente por acidente celular, como perturbações por agentes tóxicos ou lesões físicas (Steller, 1995; Edinger e Thompson, 2004).



**Figura 2.** Processo de carcinogênese. Adpatado de Oliveira *et al.* (2007). Inicialmente a célula normal sofre agressão (agentes: químicos, físicos, etc.) o que poderá levar a mutações a nível celular (DNA). Estas mutações poderão ser reparadas pelos mecanismos enzimáticos. As células com mutações poderão ser removidas pelo processo de apoptose, caso não for possível estas seguem para uma fase de promoção. Nesta fase as células iniciadas poderão também ser eliminadas pela apoptose, caso tal não se verificar segue-se uma fase de progressão, considerada irreversível, de instabilidade genética, mudanças nas características bioquímicas e morfológicas das células (Dixon e Kopras, 2004).

A situação actual do cancro é caracterizada pela existência de tratamentos de elevado custo e sucesso terapêutico relativamente reduzido. Há diversas classes farmacológicas disponíveis para tratamento do cancro, mas nenhuma delas tem se mostrado capaz de erradicar as células cancerígenas sem afectar os tecidos não cancerosos (Salmon e Sartorelli, 2003). Porém, compostos com actividade antioxidante poderão ter um papel importante na estimulação do sistema imunitário responsável pela eliminação de células cancerosas (Xiao *et al.*, 2010).

Possíveis compostos bioactivos presentes nas microalgas podem desempenhar um papel fundamental na prevenção dos vários mecanismos bioquímicos associados e responsáveis às doenças provocadas por stress oxidativo das células, como as neurodegenerativas e vários tipos de tumores.

## **1.6. NEUROPROTECÇÃO**

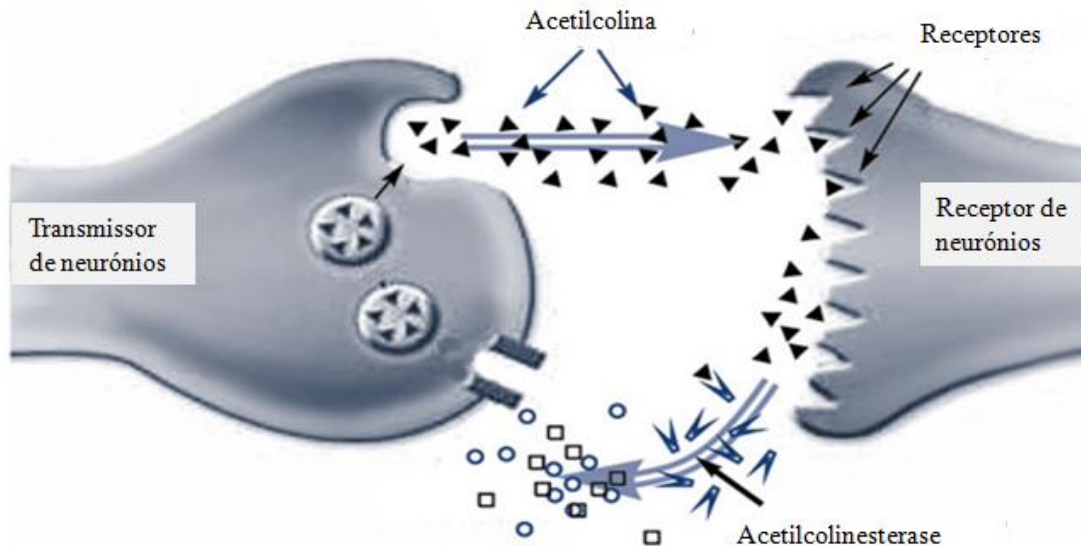
A estratégia para tratar uma doença através da prevenção da morte neuronal é designada por neuroprotecção (Levin, 1999). A neuroprotecção é um mecanismo que tem sido desenvolvido ao longo das últimas três décadas para combater várias doenças neurodegenerativas e traumatológicas, tais como, as doenças de Parkinson e Alzheimer, HIV, epilepsia, esclerose amiotrófica lateral, isquémia cerebral aguda e traumatismo neuronal (Kwon *et al.*, 2000).

As possíveis formas de neuroprotecção englobam vários componentes envolvidos no desencadeamento deste processo, desde a modulação imunológica condições pré-existentes até aos métodos farmacológicos, nos quais se incluem os antagonistas do glutamato, os bloqueadores dos canais de cálcio, os factores inibidores da óxido nítrico sintetase, os inibidores da apoptose e por fim os compostos responsáveis pela remoção das espécies reactivas de oxigénio (Levin, 1999; Libby *et al.*, 2005).

### **1.6.1. ACETILCOLINA (ACh) E ACETILCOLINESTERASE (AChE)**

A ACh foi a primeira molécula identificada como neurotransmissor, e desde então passou-se a ser realizado pesquisas para compreender a sua importância nas sinapses nos sistemas nervoso central (SNC) e periférico (SNP; Descarries *et al.*, 1997). A ACh (Fig. 3) é libertada na cavidade sináptica e liga-se aos seus receptores na membrana pós-sináptica, sendo a sua acção finalizada por colinesterases presentes na sinapse (Massoulie, 2002).

A AChE (Fig. 3) é uma hidrolase de serina que catalisa a hidrólise da ACh nas sinapses do SNC e nas junções neuromusculares, sendo considerada uma importante enzima reguladora e óptimo indicador da actividade colinérgica (Soreq e Seidman, 2001). Esta enzima desempenha um papel fundamental na regulação de muitas funções vitais, nomeadamente, na aprendizagem e memória, processamento da informação sensorial, organização cortical do movimento e do controlo do fluxo sanguíneo cerebral (Mesulam *et al.*, 2002).



**Figura 3.** Mecanismo de acção da acetilcolinesterase (AChE). A transmissão sináptica da acetilcolina (ACh) no terminal nervoso, termina com a degradação da ACh pela enzima AChE. A AChE encontra-se na membrana pós-sináptica. A ACh liga-se ao centro activo da AChE e é degradada em colina e acetato, resultando na terminação do impulso nervoso. Os inibidores de AChE previnem a hidrólise da ACh, aumentando a sua biodisponibilidade na fenda sináptica. Muitos inibidores da AChE são actualmente muito usados para o tratamento da doença do Alzheimer como por exemplo a Galantamina. (<http://www.meandmydiabetes.com/wp-content/uploads/2011/09/acetylcholine-dec.galantamine.fig.1.jpg>).

Em estudos realizados com humanos e ensaios experimentais de diabetes tem se constatado alterações na actividade da AChE, o que poderá sugerir possíveis alterações no processo de neurotransmissão colinérgica, provavelmente associada com as disfunções cognitivas observadas nesta endocrinopatia (Sanchez-Chavez e Salceda, 2000; Chopra e Kuhad, 2007). Esta enzima foi identificada também em linfócitos, onde presumivelmente desempenha um papel importante na regulação das funções do sistema imunitário (Kawashima e Fujii, 2000).

### 1.6.2. METAIS PESADOS: FERRO ( $Fe^{2+}$ ) E COBRE ( $Cu^{2+}$ )

O ferro e o cobre e muitos outros metais pesados são indispensáveis para o funcionamento normal dos processos biológicos, mas estes deverão ser ingeridas em quantidades adequadas as necessidades do organismo. Quando estes compostos químicos forem consumidos em excesso podem constituir riscos para a saúde e daí desencadear várias doenças. O excesso de ferro nos organismos associado a problemas genéticos (hemocromatose) pode provocar lesões graves a esse grupo de indivíduos. Esta doença caracteriza-se pela deposição excessiva de ferro nos tecidos, como resultado do aumento de

absorção de ferro pelo intestino ao longo do tempo. O ferro é um metal que pode acumular no fígado e no pâncreas podendo causar a cirrose e diabetes, respectivamente. Pode também acumular no coração, nas articulações e nos ossos (Feder, 1996) e ainda pode provocar cancro do colo-rectal em seres humanos (Kato *et al.*, 1999). As doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson são doenças que estão associadas a concentrações de ferro nos organismos. Uma vez que concentrações elevadas do ferro podem provocar stress oxidativo celular, fazendo com que as células neuronais fiquem susceptíveis a estes processos (Pinero *et al.*, 2000).

O cobre é um metal de transição considerado um oligoelemento essencial e necessário para uma variedade de processos celulares, tais como o metabolismo oxidativo, a síntese de neurotransmissores, desintoxicação de radicais livres, absorção de ferro e na maturação do tecido conjuntivo (Danks, 1989; Vulpe e Packman, 1995). As concentrações elevadas de cobre podem ser tóxicas para o funcionamento normal das células. Com o intuito de equilibrar os efeitos benéficos e tóxicos deste elemento essencial, todos os organismos possuem mecanismos homeostáticos que controlam de forma adequada a acumulação celular, distribuição e desintoxicação do cobre. As doenças genéticas de Wilson (excesso de cobre) e a de Menkes (deficiência de cobre) que prevalecem em seres humanos, estando associadas a alterações do transporte de cobre, mostram a vital importância de manter o equilíbrio crítico deste composto no organismo (Roos *et al.*, 2006; Bie *et al.*, 2007).

## **1.7. FONTES DE COMPOSTOS BIOACTIVOS**

Os organismos marinhos englobam aproximadamente metade da biodiversidade total na terra e os ecossistemas marinhos representam uma potencial fonte de biocompostos para a descoberta de medicamentos destinados aos tratamentos terapêuticos (Faulkner, 2002; Blunt *et al.*, 2005).

### **1.7.1. COMPOSTOS BIOACTIVOS DE ORGANISMOS MARINHOS**

Nos últimos anos, vários compostos bioactivos têm sido extraídos de diversos organismos marinhos tais como esponjas, tunicados, algas, corais moles, aplísias, entre outros (Haefner, 2003; Donia e Hamann, 2003). A pesquisa de novos compostos bioactivos

em organismos marinhos resultou no isolamento de mais de 10.000 metabolitos (Fuesetani, 2000), muitos dos quais dotados de propriedades farmacodinâmicas.

A maioria dos estudos relativos à avaliação de actividades biológicas como forma de encontrar compostos bioactivos com potencial aplicação no tratamento de várias doenças têm como alvo animais marinhos, e muitos deles apresentam importantes actividades biológicas, tais como antioxidante, antitumoral, antiinflamatória e antibacteriana (Tabela 1).

Vários metabolitos bioactivos foram identificados em mais de 11 géneros de esponjas, sendo que 3 desses géneros (*Haliclona*, *Petrosia* e *Discodemia*) produzem compostos anticancerígenos e antiinflamatórios (Blunt *et al.*, 2004). A descoberta da espongouridina, um inibidor potente de tumores obtido na esponja *Cryptotethya crypta*, despertou a atenção para as esponjas como uma fonte de metabolitos importantes com utilização biomédica. A identificação da espongouridina conduziu à síntese de uma nova classe de análogos de nucleosídeos de arabinose, um dos quais a citosina arabinosilada, que é convertida em trifosfato de citosina arabinosilada, sendo incorporada no DNA celular e tendo como função inibir a DNA polimerase. Este medicamento já se encontra em uso clínico para o tratamento da leucemia aguda mielocítica e linfoma “não-Hodgkin” (Ireland *et al.*, 1993).

Estudos acerca da farmacologia pré-clínica e clínica de conotoxinas resultaram no equivalente sintético do  $\omega$ -conopéptido MVIIA, um peptídeo de 25 aminoácidos polibásicos derivados do gastropode marinho, *Conus magus*, tendo recebido a aprovação da autoridade reguladora *Food and Drug Administration* (FDA) em 23 de Dezembro de 2004. Actualmente a ziconotida (*Prialt*<sup>®</sup>) é comercializada pela Elan Biopharmaceuticals, e constitui o terceiro medicamento na farmacopeia dos EUA que deriva de produtos químicos marinhos. É usado como analgésico em pacientes com HIV e cancro (Staats *et al.*, 2004). Um outro medicamento é o *Yondelis*<sup>®</sup> desenvolvido pela Pharmamar a partir da trabectedina, um produto proveniente de um tunicado (*Ecteinascidia turbinata*) e indicado para o tratamento do cancro de ovário (Newman e Cragg, 2004).

**Tabela 1.** Actividades biológicas e compostos bioactivos isolados de diversos organismos marinhos.

Filo	Espécies	Biocompostos	Actividade biológica	Autores
<i>Actinobacteria</i>	<i>Streptomyces sp.</i>	trioxacarcina A e D	Antiplasmódica	Maskey <i>et al.</i> (2004)
<i>Porifera</i>	<i>Spongia spp.</i>	espongstatina	Antitumoral	Pettit <i>et al.</i> (1993)
	<i>Agelas sp.</i>	nagelamida G	Antibacteriana	Endo <i>et al.</i> (2004)
	<i>Lendenfeldia sp.</i>	deidrofurodendina	Anti-HIV1	Chill <i>et al.</i> (2004)
<i>Ectoprocta</i>	<i>Flustra foliacea</i>	deformilflustrabromina	Antitumoral	Lysek <i>et al.</i> (2002)
	<i>Watersipora subtorquata</i>	briobrantratioleno	Antiangiogénica	Jeong <i>et al.</i> (2002)
	<i>Bugula neritina</i>	briostatina	Antitumoral	Pettit (1991), Lilies (1996)
	<i>Anthia convoluta</i>	convolutamida-A	Antitumoral	Zhang <i>et al.</i> (1994)
<i>Ectoprocta</i>	<i>Cribricellina cribreria</i>	$\beta$ -carbolina	Antibacteriana Antifúngica Antiviral	Princep <i>et al.</i> (1991)
<i>Mollusca</i>	<i>Dolabella auricularia</i>	dolastatina	Antineoplásica	Pettit <i>et al.</i> (1989)
	<i>Chromocloris cavae</i>	cromodorólido-A	Antimicrobiana antitumoral	Morris <i>et al.</i> (1990)
	<i>Bursatella leachii</i>	bursatelanina-P	Anti-HIV	Rajaganapathi <i>et al.</i> (2002)
<i>Cnidaria</i>	<i>Pseudopterogorgia elisabethae</i>	pseudopterossina X e Y	Antimicrobiana	Ata <i>et al.</i> (2004)
	<i>Pseudopterogorgia kallos</i>	bielschowskysina	Antimalárica	Marrero <i>et al.</i> (2004)
	<i>Pseudopterogorgia sp.</i>	pseudopetrocina-E	Anti-inflamatória e analgésica	Carte (1996)
	<i>Subergorgia suberosa</i>		Antitumoral	Wang <i>et al.</i> (2002)
<i>Annelida</i>	<i>Arenicola marina</i>	arenicina-1 e 2	Antibacteriana	Ovchinnikova <i>et al.</i> (2004)
<i>Echinodermata</i>	<i>Ludwigothurea grisea</i>	sulfato de condroitina fucosilado	Anticoagulante	Zancan e Mourao (2004)
	<i>Certonardoa semiregularis</i>	certonardósidos A-J	Anti- HIV	Wang <i>et al.</i> (2002)
<i>Tunicata</i>	<i>Cystodytes dellechiajei</i>	sebastianinas A e B	Antitumoral	Torres <i>et al.</i> (2002)
	<i>Clavelina oblonga</i>	(2S,3R)-2-aminododecano-3-ol	Antifúngica	Kossuga <i>et al.</i> (2004)
<i>Rhodophyta</i>	<i>Sphaerococcus coronopifolius</i>		Antibacteriana	Donia e Hamann (2003)
	<i>Hypnea valitiae</i>	nucleosídeo iodado	Inibidor da adenosina cinase	Ireland <i>et al.</i> (1993)
<i>Chlorophyta</i>	<i>Ulva lactuca</i>		Anti-inflamatória	Garg <i>et al.</i> (1992)
	<i>Ulva fasciata</i>	esfingosina	Antiviral <i>in vivo</i>	Garg <i>et al.</i> (1992)
<i>Phaeophyta</i>	<i>Stypodium zonale</i>	estipoldiona	Inibição polimerização dos microtúbulos	Jacobs <i>et al.</i> (1985)
	<i>Dictyota menstrualis</i>	diterpenos: Da-1 e ACDA-1	Inibição replicação do vírus HIV-1 na linha celular PM-1 <i>in vitro</i>	Pereira <i>et al.</i> (2004)
	<i>Cystoseira myrica</i>	cistoseirol monoacetato	Antitumoral	Ayyad <i>et al.</i> (2003)

### 1.7.2. BIOCÓMPOSTOS ISOLADOS A PARTIR DE MICROALGAS

As microalgas (Tabela 2) são consideradas uma importante fonte natural de novos compostos bioativos incluindo os vários nutrientes: proteínas, glícidos, vitaminas, minerais e ácidos gordos, bem como os pigmentos carotenóides, tais como xantofilas e carotenos (Gouveia *et al.*, 1996; Margalith *et al.*, 1999; Lorenz e Cysewski, 2000; Li *et al.*, 2002; Fazeli *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2006; Del Campo *et al.*, 2007).

**Tabela 2.** Actividades biológicas e biocómpostos isolados a partir de microalgas.

Filo	Espécies	Biocómpostos	Actividade biológica	Autores
<i>Cyanobacteria</i>	<i>Lyngbya lagerhaimanii</i> e <i>Phormidium tenue</i>	microcolina-A	Anti-HIV	Yamada <i>et al.</i> (2002)
	<i>Lyngbya majusculata</i>		Suprime as 2 vias da reacção mista de linfócitos em ratinho	Koehn <i>et al.</i> (1992)
	<i>Lyngbya majusculata</i>		Antiproliferativa	Carte (1996)
<i>Dinophyta</i>	<i>Goniodoma pseudogoniaulax</i>	goniodomina-A	Inibição de angiogénese; crescimento fibroblastos (bFGF).	Abe <i>et al.</i> (2002)
	<i>Gambierdiscus toxicus</i>	brevitoxinas	Antifúngicos	Carte (1996)
	<i>Ptychodiscus brevis</i>		Neuroprotectora	Carte (1996)
<i>Chlorophyta</i>	<i>Dunaliella salina</i>	$\beta$ -caroteno	Antioxidante Imunomodulação	Mendes <i>et al.</i> (2003)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	astaxantina	Antitumoral	Mendes <i>et al.</i> (1995)
	<i>Chlorella ellipsoidea</i>	xantofila	Antitumoral	Cha <i>et al.</i> (2008)

### 1.8. OBJECTIVOS

As microalgas são consideradas fontes promissoras de compostos bioativos, e muito poucos estudos existem em relação a actividade biológica destes organismos. Dos estudos realizados com microalgas foram maioritariamente usadas as cianobactérias (procariontas), que é o grupo mais bem estudado em termos de compostos bioativos, enquanto que pouco ou nada sabe acerca de bioactividade em microalgas eucariotas.

Sendo as microalgas usadas neste estudo espécies com valor nutricional e comercial considerável, e servindo de alimento na aquacultura para diferentes espécies de organismos (Brown *et al.*, 1997), é de extrema importância e necessário desenvolver estudos direccionados a elas como forma de valorizar e beneficiar das prováveis actividades biológicas que os compostos bioquímicos contidas nelas poderão apresentar. Entretanto, este trabalho surge como forma de pesquisar compostos bioactivos provenientes de microalgas e a sua aplicação na produção de medicamentos com utilidade no campo de tratamento biomédico. Sabendo que, actualmente existe a necessidade urgente de descobrir novos biocompostos para produção de medicamentos, para contornar o crescente aumento e resistência de várias doenças que afligem a nossa sociedade. No entanto, este trabalho visou a avaliação de actividades biológicas relevantes para a saúde humana de diferentes extractos de várias microalgas.

### 1.8.1. OBJECTIVO GERAL

- Avaliar a actividade biológica de extractos de diferentes espécies de microalgas: *B. braunii*, *I. galbana* T-ISO, *N. oculata*, *Tetraselmis sp.* e *Scenedesmus sp.*

### 1.8.2. OBJECTIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a actividade antioxidante através de métodos complementares (actividade de *scavenging* dos radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup>);
- 2) Analisar a actividade antitumoral *in vitro* na linha celular tumoral humana, HepG2;
- 3) Calcular a selectividade dos extractos em relação a uma linha celular não-tumoral (S17);
- 4) Determinar a actividade neuroprotectora através da avaliação da inibição da enzima acetilcolinesterase e actividade quelante dos iões metálicos Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. PREPARAÇÃO DOS EXTRACTOS**

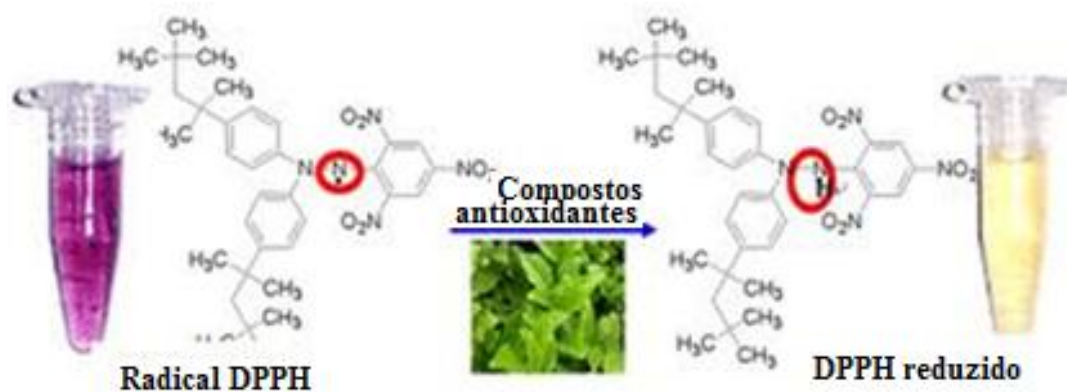
As microalgas usadas para a realização deste estudo (*B. braunii*, *I. galbana* T-ISO, *N. oculata*, *Tetraselmis sp.*, e *Scenedesmus sp.*) foram fornecidas pela empresa NECTON S.A.

A extracção dos compostos bioactivos foi feita de modo sequencial utilizando solventes de polaridade crescente. Alíquotas de 1 g de biomassa liofilizada e congelada foram misturadas com 10 mL de hexano (IP=0,1) e homogeneizadas com um dispersador IKA Ultra Turrax (2 ciclos de 1 min cada), à temperatura ambiente (TA). Os tubos contendo as alíquotas foram então vortexados (1min), centrifugados a 5000 g durante 10 minutos e o sobrenadante transferido para um frasco (Schott; 250 mL). A extracção foi repetida mais 3 vezes e os 4 sobrenadantes combinados. O sedimento foi submetido ao mesmo procedimento, à excepção da homogeneização com o dispersador, com éter dietílico (IP=2,8), acetona (IP=5,1) e água Mili-Q (IP=10,2). Os extractos foram filtrados com papel de filtro Whatman nº 4. Os extractos orgânicos foram evaporados num evaporador rotativo sob pressão controlada e baixa temperatura adequada ao ponto de ebulição de cada solvente, e os extractos aquosos foram liofilizados. Os extractos secos foram pesados, ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) e armazenados a -20°C até posterior uso.

### **2.2. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE**

#### **2.2.1. MÉTODO DE 1,1-DIFENIL-2-PICRIHIDRAZIL (DPPH)**

O radical DPPH é amplamente usado para determinar a actividade antioxidante de compostos naturais (Fig. 4). O DPPH<sup>•</sup> é um radical livre e estável que aceita um electrão ou então um hidrogénio radical. Este composto apresenta absorção característica a 517 nm (violeta). Neste ensaio os compostos antioxidantes são capazes de reduzir o radical estável (DPPH), que é revelada por uma diminuição da absorvância (amarela) devido a reacção entre os compostos antioxidantes e o radical, o que resulta na eliminação/redução do radical pela doação de hidrogénio ou um electrão (Hou *et al.*, 2004; Elmastas *et al.*, 2007; Saha *et al.*, 2008; Chattopadhyay *et al.*, 2009).



**Figura 4.** Estabilização/Redução do radical DPPH<sup>·</sup> na presença de compostos antioxidantes  
(<http://www.naturalsolution.co.kr/tech21e.html>)

Para este trabalho foi usado o método proposto por Brand-Williams *et al.* (1995). Em cada poço de uma placa transparente de 96 poços foram adicionados 22  $\mu\text{L}$  da amostra (concentrações de 1, 5 e 10  $\text{mg/mL}$  em triplicados) e 200  $\mu\text{L}$  de uma solução metanólica de DPPH (120  $\mu\text{M}$ ). As placas foram incubadas durante 30 minutos à TA e ao abrigo da luz. A absorvância foi lida a um comprimento de onda de 492 nm. Os resultados foram expressos como percentagem de inibição (% I) calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$\%I = [(A_A - A_B) / A_A] \times 100\%$ , onde  $A_A$ =absorvância do controlo negativo,  $A_B$ =absorvância amostra de teste, (Al-Dabbas *et al.*, 2006). Os resultados foram igualmente expressos em termos de  $\text{IC}_{50}$  (concentração da amostra necessária para se obter 50% de actividade antioxidante). Como controlo positivo foi utilizado o antioxidante sintético butil-hidroxitolueno (BHT) a 1  $\text{mg/mL}$ .

### 2.2.2. MÉTODO DE TEAC (*TROLOX EQUIVALENTS ANTIOXIDANT CAPACITY*)

O método TEAC foi feito de acordo com o procedimento descrito por Re *et al.* (1999), utilizando o radical ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiacolina-6-sulfónico ( $\text{ABTS}^{\cdot+}$ ). 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 em escuridão e à TA, resultando na solução mãe do radical catiónico  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ . A solução de trabalho de  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  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. O radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  é um catião gerado pela oxidação do ABTS com o persulfato de potássio, e reduzido

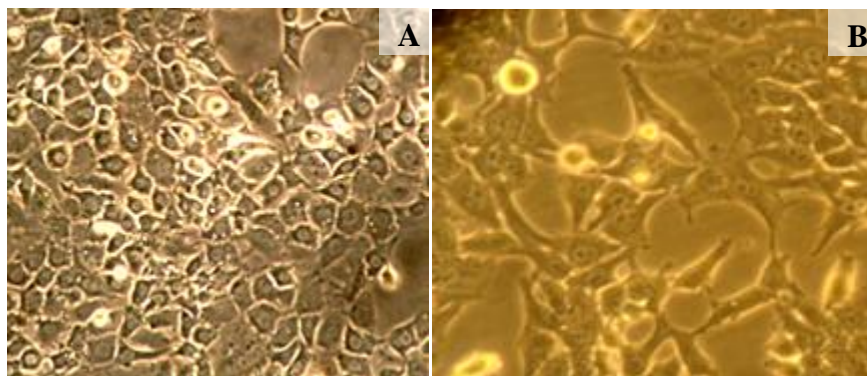
na presença de um hidrogénio dador de electrões. Este método avalia a actividade antioxidante de compostos puros e de extractos (Re *et al.*, 1999).

Em cada poço de uma placa transparente de 96 poços foram colocados 10  $\mu\text{L}$  de cada extracto (1, 5 e 10 mg/mL, trolox (ácido [6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico]; controlo positivo a 0,1-0,5 mM) ou tampão fosfato (branco). A reacção foi iniciada através da adição de 190  $\mu\text{L}$  da solução de trabalho de ABTS<sup>•+</sup>, e a absorvância medida após 6 min. a 734 nm. Os resultados foram expressos em percentagem de actividade de *scavenging* do radical ABTS<sup>•+</sup>.

## 2.3. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO*

### 2.3.1. CULTURA E MANUTENÇÃO DAS LINHAS CELULARES

Neste trabalho foram utilizadas uma linha celular tumoral humana, e uma linha celular humana não tumoral. A linha celular tumoral usada foi de cancro hepático (HepG2; Fig. 5B) e a linha celular não tumoral foi a S17 (estroma de medula óssea; Fig. 5A). A linha celular HepG2 foi gentilmente cedida pela Prof. Vera Ribeiro Marques e as S17 pelo Dr. Nuno Rodrigues dos Santos (ambos do CBME, Universidade do Algarve).



**Figura 5.** Fotos ilustrativas das linhas celulares. **A:** Células do estroma de medula óssea (S17). **B:** Células humanas de hepatocarcinoma (HepG2).

As células foram cultivadas e mantidas em meio de cultura adequado (DMEM para as S17 e RPMI1640 para as HepG2) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inactivado por aquecimento (SFB), L-glutamina (200 mM), penicilina (10.000 U/mL) e estreptomicina (10.000 U/mL), numa incubadora a 37°C, com atmosfera humidificada com

5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura das células foi mudado a cada 3 dias, e as células foram utilizadas quando atingiram 70-80% de confluência.

### 2.3.2. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Os extractos foram avaliados em termos da sua capacidade de inibição da viabilidade celular, pelo método do MTT (brometo de 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) (Mosmann, 1983). Este método baseia-se na clivagem dos sais de tetrazólio (MTT) em sais de formazão pelas desidrogenases presentes nas mitocôndrias de células viáveis (Mosmann, 1983). As células foram colocadas em placas de 96 poços e deixadas a aderir durante 24 h a 37°C e com atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Foram usadas concentrações celulares diferentes para cada tipo de linha celular, HepG2 (concentração celular= 527.5 células/mL) e S17 (concentração celular= 347.5 células/mL). Após este período, as células foram incubadas durante 72 h com 100 µL de meio de cultura contendo os extractos na concentração de 125 µg/mL.

Os extractos utilizados foram ressuspensos em DMSO, cuja concentração final não excedeu 0,5%. Duas horas antes do final da incubação, foram adicionados a cada poço 20 µL de MTT (5 mg/mL em tampão fosfato potássico, TFP), incubados por mais 2h e depois adicionados 150 µL de DMSO a cada poço para solubilizar os sais de formazão formados. A absorvância foi medida depois a 590 nm num leitor de microplacas (BioTek® Synergy 4).

O efeito da aplicação dos extractos sobre a viabilidade celular foi expressa em termos de percentagem, calculada em relação às células tratadas com DMSO na concentração de 0,5%. Foi também expressa sob a forma de IC<sub>50</sub> (concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular). Como controlo positivo foi utilizado o composto etopósido. O etopósido é um derivado semi-sintético da podofilotoxina, um alcalóide extraído da raiz da mandrágora americana (*Podophyllum peltatum*). Este composto é utilizado a nível clínico com os nomes comerciais: Etopophos®, Vepesid® no tratamento de vários tipos de cancro, principalmente do pulmão, ovários e testículos.

### 2.3.3. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE SELECTIVIDADE DOS EXTRACTOS

Os extractos que apresentaram inibição da viabilidade celular da linha tumoral HepG2 superior a 50% para a concentração de 125 µg/mL foram testados na linha celular não tumoral S17, de modo a determinar-se o índice de selectividade (IS) em relação às células tumorais. O IS foi determinado utilizando a seguinte equação (Kay, 1991):

$IS = VNT/VT$ , onde VNT refere-se à viabilidade celular nas células não-tumorais (S17) e VT refere-se à viabilidade celular nas células tumorais (HepG2).

## 2.4. AVALIAÇÃO DA ACTIVIDADE NEUROPROTECTORA

### 2.4.1. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE INIBITÓRIA DA AChE

A actividade inibitória da AChE foi avaliada de acordo com Orhan *et al.* (2007). A cada poço de uma placa transparente de 96 poços foram adicionados 140 µL de tampão fosfato de sódio (0,1 mM, pH 8,0), 20 µL de extractos nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/mL, 20 µL da solução da enzima (0,28 U/mL). Após 15 minutos de incubação à TA foram adicionados 10 µL da solução de iodeto de acetiltiocolina (4 mg/mL) para iniciar a reacção e de seguida adicionou-se 20 µL de ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzóico) (DTNB, 1,2 mg/mL). A hidrólise do iodeto de acetiltiocolina foi monitorizada pela formação de uma coloração amarela, característica do anião 5-tio-2-nitrobenzoato como resultado da reacção do DTNB com a tiocolina, através da leitura da absorvância a um comprimento de onda de 412 nm.

A percentagem de inibição da actividade de AChE foi determinada através da seguinte fórmula:

$AChE (\%) = [(A_{\text{controlo}} - A_{\text{amostra}})/A_{\text{controlo}}] \times 100$ , onde  $A_{\text{controlo}}$  é a actividade da enzima sem amostra e  $A_{\text{amostra}}$  é a actividade da enzima com amostra. Como controlo positivo foi utilizada a galantamina na concentração de 1 mg/mL. A galantamina é um alcalóide extraído da planta herbácea ‘campanilha-de-inverno’ (*Galantus nivalis*). Esta substância é um inibidor da AChE e é utilizada a nível clínico para alívio nos sintomas associados à doença de Alzheimer com as designações comerciais Nivalin<sup>®</sup>, Razadyne<sup>®</sup>, Razadyne ER<sup>®</sup>, Reminyl<sup>®</sup> ou Lycoremine<sup>®</sup>.

#### 2.4.2. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE QUELANTE

A actividade quelante dos iões metálicos  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  foi avaliada nos extractos, nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/mL, através do método descrito por Megías *et al.* (2009), com algumas adaptações. A actividade quelante foi comparada com a actividade do agente quelante ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA), aplicado na concentração de 1 mg/mL.

A actividade quelante contra o  $\text{Fe}^{2+}$  foi determinada através da formação do complexo  $\text{Fe}^{2+}$ -ferrozina. As amostras foram misturadas em microplacas de 96 poços com 200  $\mu\text{L}$  de água destilada, 30  $\mu\text{L}$  de extracto e 30  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de  $\text{FeCl}_2$  (0,1 mg/mL). Após um tempo de espera de 30 minutos, foi adicionado a cada poço 12,5  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de ferrozina (40 mM). Ao fim de 10 minutos a mudança na cor foi lida a uma absorvância de 562 nm, num leitor de microplacas.

A actividade quelante contra o  $\text{Cu}^{2+}$  foi determinada usando o pirocatecol violeta (PV). As amostras foram misturadas em microplacas de 96 poços com 200  $\mu\text{L}$  de tampão acetato de sódio (50 mM), 30  $\mu\text{L}$  de extracto, 1  $\mu\text{g}$  de cobre (sob a forma de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), e 6  $\mu\text{L}$  de PV. De seguida as mudanças na cor foram lidas a 632 nm, num leitor de microplacas (BioTek<sup>®</sup> Synergy 4).

#### 2.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicados e os resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão (EP). Os dados foram submetidos a análise de variâncias (ANOVA) e de seguida procedeu-se a avaliação das interacções e verificação da existência de diferenças significativas entre os experimentos, usando o teste de variáveis múltiplas de *Duncan*, quando o teste *F* for significativo, através do software estatístico SPSS 17.0 (*Statistical Package for the Social Sciences 17.0*). Os valores com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Para a determinação das concentrações de inibição ( $\text{IC}_{50}$ ) dos diferentes extractos foi usado o software *GraphPad Prism 5*.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. RENDIMENTO DE EXTRACÇÃO DA BIOMASSA ALGAL

A Tabela 3 mostra o rendimento (%) da extracção para cada espécie analisada. Os resultados indicam que as microalgas em estudo são constituídas por compostos de polaridade diferente. De facto, enquanto que as espécies *B. braunii*, *N. oculata* e *Tetraselmis sp.* parecem ser compostas maioritariamente por compostos polares, extraídos pela água, a espécie *I. galbana* T-ISO parece ter uma elevada quantidade de compostos de polaridade baixa, extraídos pelo hexano.

**Tabela 3.** Rendimento (%) da extracção de diferentes espécies de microalgas.

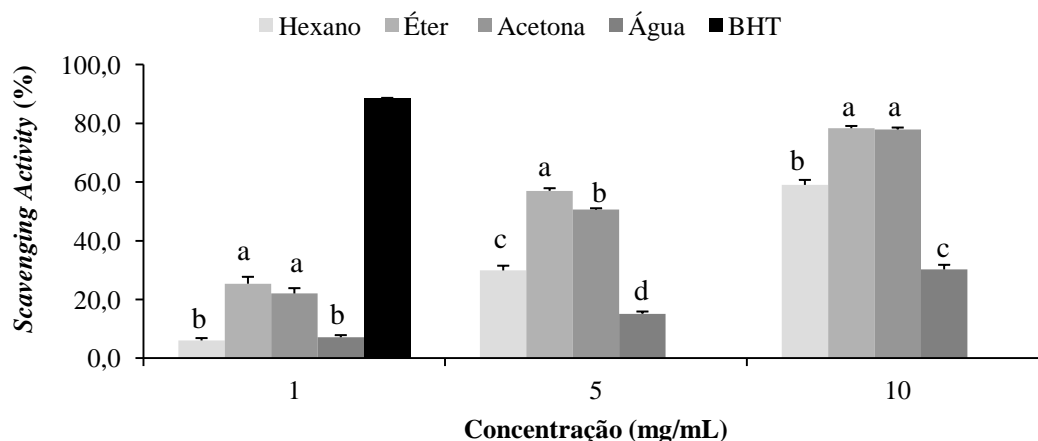
<b>Espécies</b>	<b>Extractos</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>Rendimento</b>
<i>B. braunii</i>	Hexano	91,0	0,76
	Éter	57,9	0,48
	Acetona	126,9	1,06
	<b>Água</b>	320,1	<b>2,67</b>
<i>I. galbana</i> T-ISO	<b>Hexano</b>	1342,2	<b>11,19</b>
	<b>Éter</b>	347,4	<b>2,90</b>
	<b>Acetona</b>	403,9	<b>3,37</b>
	<b>Água</b>	483,0	<b>4,03</b>
<i>N. oculata</i>	Hexano	161,6	1,35
	Éter	111,2	0,93
	Acetona	180,4	1,50
	<b>Água</b>	346,9	<b>2,89</b>
<i>Tetraselmis sp.</i>	Hexano	125,7	1,05
	Éter	98,2	0,82
	Acetona	193,7	1,61
	<b>Água</b>	740,8	<b>6,17</b>
<i>Scenedesmus sp.</i>	Hexano	74,1	0,62
	Éter	186,7	1,56
	Acetona	196,3	1,64
	Água	150,9	1,26

## 3.2. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

### 3.2.1. MÉTODO DE DPPH

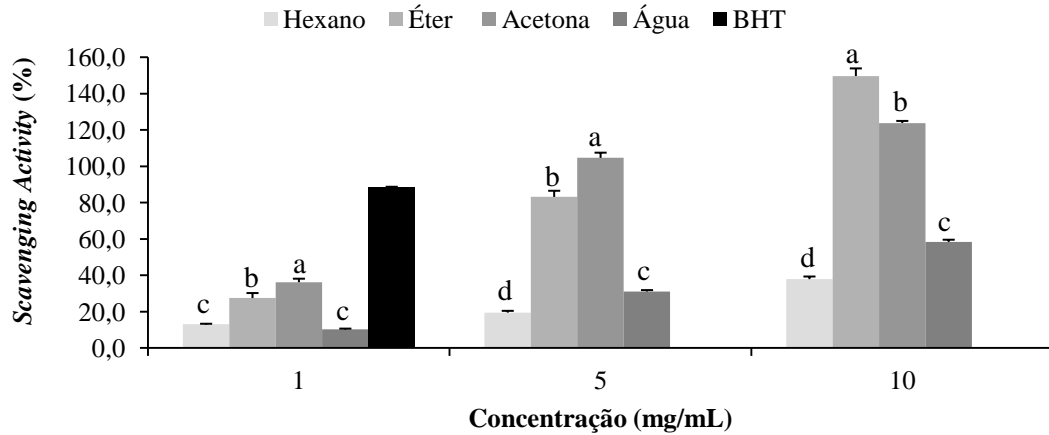
No geral a actividade antioxidante (%) determinada através do método de DPPH para os diferentes extractos de microalgas apresentou diferenças estatisticamente significativas para as concentrações testadas, tendo-se verificado o aumento da actividade antioxidante com o aumento da concentração dos extractos ( $p < 0,05$ ; Figs. 6.1-10.5). A actividade antioxidante variou entre 6,06% (*B. braunii*; extracto de hexano; 1 mg/mL; Fig. 6.1) e 149,63% (*I. galbana* T-ISO; extracto de éter; 10 mg/mL; Fig. 7.2).

Relativamente a espécie *B. braunii*, os extractos com maior actividade de *scavenging* do radical DPPH foram os de éter e de acetona na concentração de 10 mg/mL (Fig. 6.1).



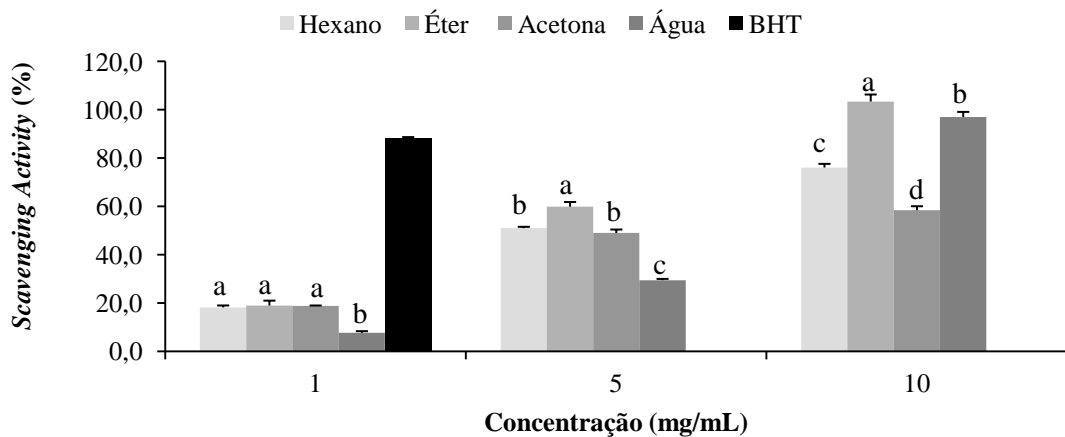
**Figura 6.1.** Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga *B. braunii*, determinada através do método de DPPH. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. BHT (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Os extractos da espécie *I. galbana* T-ISO com maior bioactividade foram os de éter e acetona, na maior concentração testada (Fig. 7.2).



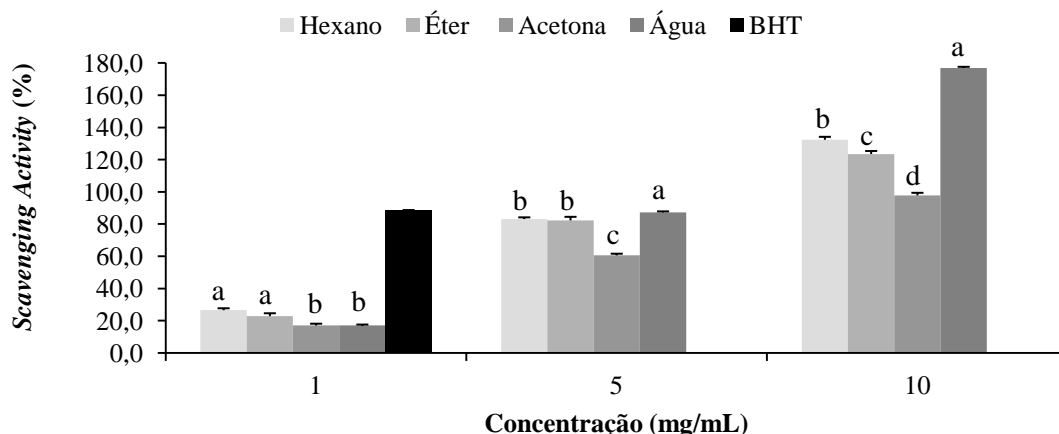
**Figura 7.2.** Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga *I. galbana* T-ISO, determinada através do método de DPPH. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. BHT (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

No caso da espécie *N. oculata*, a maior actividade de *scavenging* do radical DPPH foi observada nos extractos de éter e de água na concentração de 10 mg/mL, como mostra a Fig. 8.3.



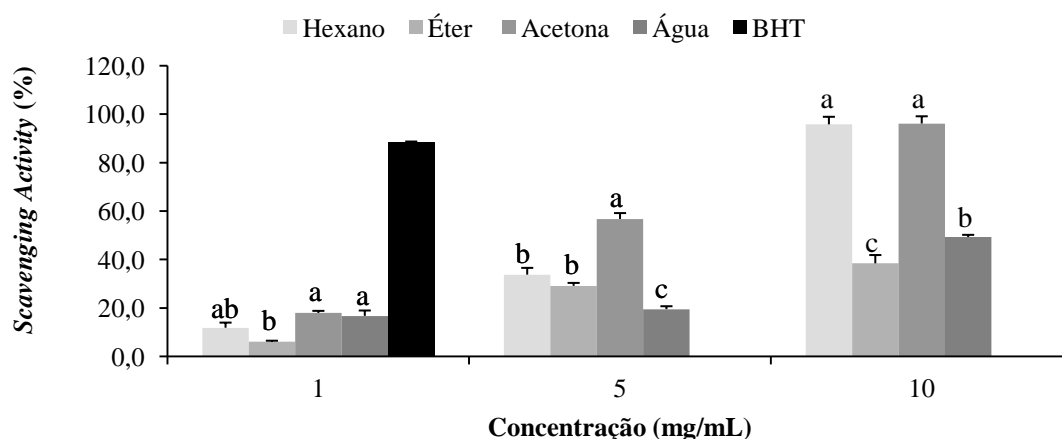
**Figura 8.3.** Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga *N. oculata*, determinada através do método de DPPH. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. BHT (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Os extractos de hexano e de água na maior concentração apresentaram os valores mais elevados de actividade antioxidante para a espécie *Tetraselmis* sp. (Fig. 9.4).



**Figura 9.4.** Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga *Tetraselmis sp.*, determinada através do método de DPPH. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. BHT (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Em relação a microalga *Scenedesmus sp.* verificou-se que os extractos de hexano e de acetona foram os mais bioactivos na concentração de 10 mg/mL (Fig. 10.5).



**Figura 10.5.** Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga *Scenedesmus sp.*, determinada através do método de DPPH. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. BHT (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

As espécies *I. galbana* T-ISO e *Tetraselmis sp.* apresentaram os valores mais elevados de actividade antioxidante. O extracto de acetona da *I. galbana* T-ISO revelou ser a mais bioactiva, com um valor de IC<sub>50</sub> de 1,90 mg/mL, enquanto que os extractos de hexano e de éter da espécie *Tetraselmis sp.* apresentaram valores de 2,41 mg/mL e 2,52 mg/mL,

respectivamente (Tabela 4). Todos os extractos analisados apresentaram valores de IC<sub>50</sub> superiores a BHT (0,07 mg/mL;  $p < 0,05$ ).

**Tabela 4.** Actividade antioxidante determinada através do método de DPPH (IC<sub>50</sub>, mg/mL) de diferentes extractos de espécies de microalgas.

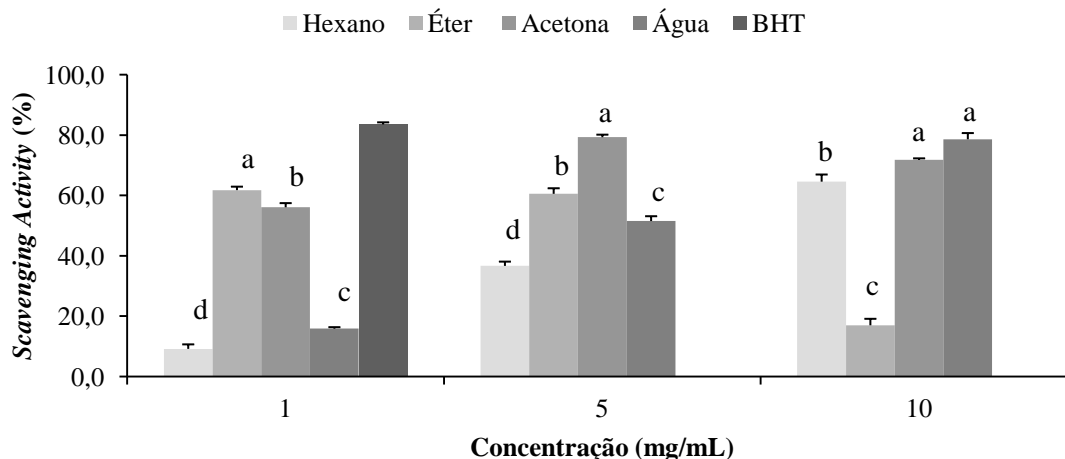
Espécie	Hexano	Éter	Acetona	Água
<i>B. braunii</i>	8,55 ± 0,58a	4,02 ± 0,14a	3,96 ± 0,27b	-
<i>I. galbana</i> T-ISO	-	3,09 ± 0,01b	<b>1,90</b> ± 0,04c	9,47 ± 1,03a
<i>N. oculata</i>	4,93 ± 0,37bc	4,19 ± 0,17a	6,70 ± 0,44a	7,31 ± 0,71a
<i>Tetraselmis</i> sp.	<b>2,41</b> ± 0,40c	<b>2,52</b> ± 0,15b	4,35 ± 0,21b	4,46 ± 0,01b
<i>Scenedesmus</i> sp.	6,53 ± 0,19ab	-	3,56 ± 0,14b	-
BHT*		0,07 ± 0,00		

Os valores representam médias ± EP de 9 replicados. \*BHT (controlo positivo). - não determinado. O tratamento estatístico foi feito entre diferentes espécies com o mesmo extracto. Os valores seguidos com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2. MÉTODO DE ABTS

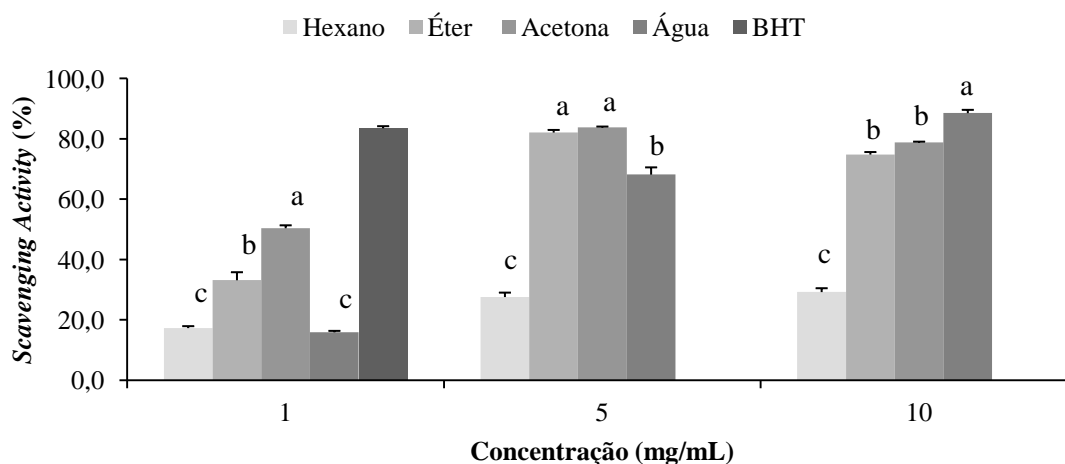
A actividade antioxidante determinada pelo método de ABTS para os diferentes extractos das microalgas analisadas revelaram diferenças significativas entre as três concentrações analisadas ( $p < 0,05$ ; Figs. 11.1-15.5). A média de actividade de *scavenging* (%) dos diversos extractos variou entre 6,86% (hexano, 10 mg/mL; Fig. 14.4) e 89,03% (aquoso, 10 mg/mL; Fig. 14.4). Nos extractos de éter e de acetona observou-se que para concentrações superiores a 5 mg/mL a actividade antioxidante diminui, em todas as espécies estudadas.

Os extractos de éter (5 mg/mL) e de água (10 mg/mL) apresentaram os valores mais elevados para a espécie *B. braunii* (Fig. 11.1).



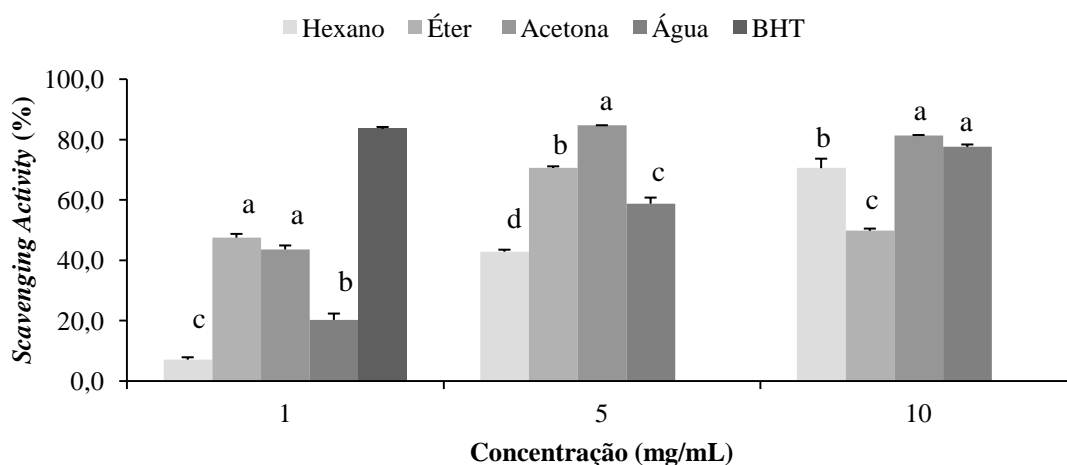
**Figura 11.1.** Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga *B. braunii*, determinada através do método de ABTS. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. BHT (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Quanto à microalga *I. galbana* T-ISO os extractos com maior percentagem de actividade de *scavenging* do radical  $ABTS^{+}$  (Fig. 12.2) foram os de acetona e de água nas concentrações de 5 e 10 mg/mL, respectivamente.



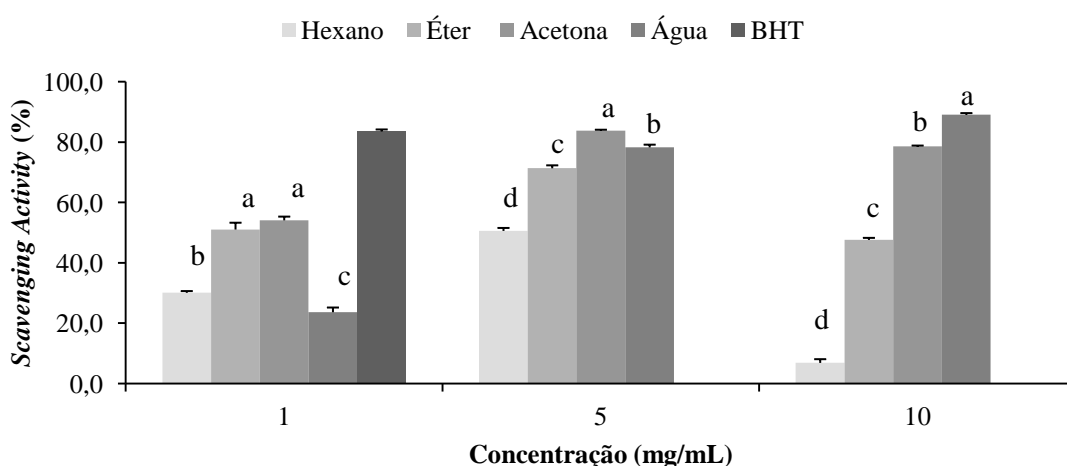
**Figura 12.2.** Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga *I. galbana* T-ISO, determinada através do método de ABTS. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. BHT (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Para a espécie *N. oculata* o extracto com maior actividade antioxidante foi o de acetona (5 mg/mL), como mostra a Fig. 13.3.



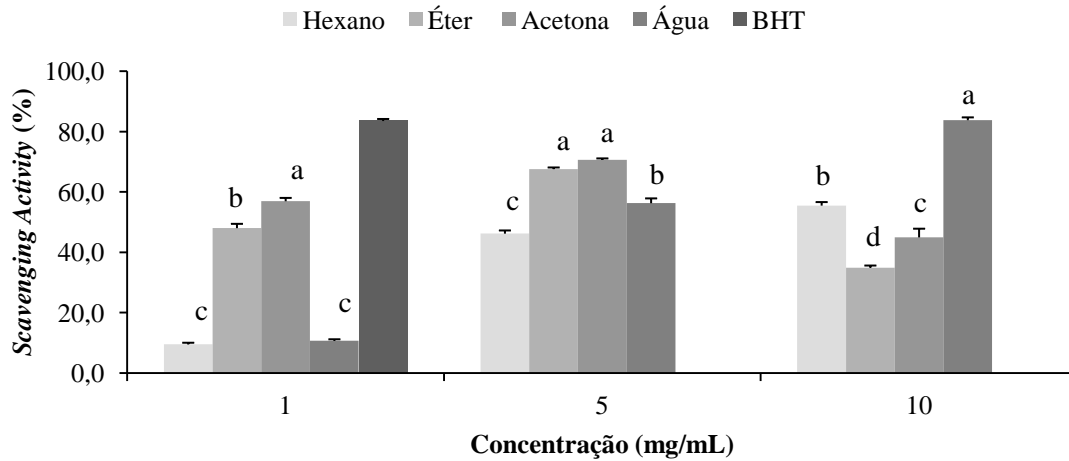
**Figura 13.3.** Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga *N. oculata*, determinada através do método de ABTS. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. BHT (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Como mostra a Fig. 14.4 os extractos de acetona (5 mg/mL) e de água (10 mg/mL) da espécie *Tetraselmis sp.* foram os que apresentaram actividade mais elevada de *scavenging* do radical ABTS<sup>•+</sup>.



**Figura 14.4.** Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga *Tetraselmis sp.*, determinada através do método de ABTS. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. BHT (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

No caso da espécie *Scenedesmus sp.*, a maior actividade antioxidante foi observada no extracto de água (10 mg/mL; Fig. 15.5).



**Figura 15.5.** Actividade antioxidante (%) de diferentes extractos da microalga *Scenedesmus sp.*, determinada através do método de ABTS. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. BHT (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Os extractos de acetona e de água nas concentrações de 5 e 10 mg/mL foram os mais bioactivos em todas as espécies analisadas. Na concentração de 5 mg/mL das espécies *N. oculata* ( $84,70 \pm 0,08\%$ ; extracto: acetona) e *Tetraselmis sp.* ( $83,79\%$ ; extracto: água) registou-se valores de actividade de *scavenging* semelhantes a do controlo positivo, BHT ( $83,52\%$ ;  $p < 0,05$ ).

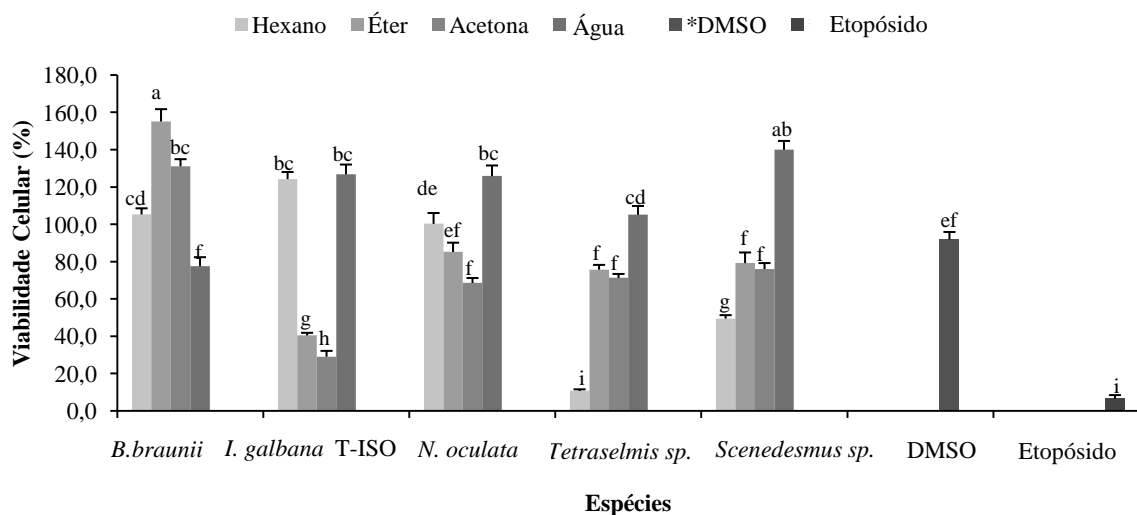
Os extractos de água das espécies *I. galbana* T-ISO ( $88,52\%$ ; Fig. 7.2) e do *Tetraselmis sp.* ( $89,03\%$ ; Fig. 7.4) apresentaram valores de actividade antioxidante superiores ao BHT ( $83,52\%$ ;  $p < 0,05$ ) na concentração 10 mg/mL.

### 3.3. ACTIVIDADE ANTITUMORAL

#### 3.3.1. MÉTODO DO MTT

Neste trabalho foi avaliada a actividade antitumoral *in vitro* de extractos e espécies seleccionadas de microalgas numa linha de cancro hepático humano (HepG2), através do método de MTT. Inicialmente todos os extractos foram testados na concentração de 125  $\mu$ g/mL, após um período de incubação de 72h, e comparados com os resultados obtidos com

a aplicação do etopósido, um composto utilizado a nível clínico para tratamento de vários tipos de cancro. As espécies *I. galbana* T-ISO (extractos de éter e acetona), *Tetraselmis sp.* (extracto de hexano) e *Scenedesmus sp.* (extracto de hexano) apresentaram a maior capacidade de redução da viabilidade celular (Fig. 16.1). De entre estas, foi o extracto de hexano da espécie *Tetraselmis sp.* o que apresentou a actividade antitumoral *in vitro* mais elevada, reduzindo a viabilidade celular a 10,81%, valor este estatisticamente igual ao do valor de etopósido ( $p < 0,05$ ; Fig. 16.1). Verificou-se ainda o estímulo da viabilidade celular para os extractos de hexano (*B. braunii* e *I. galbana* T-ISO), de éter (*B. braunii*), de acetona (*B. braunii*) e de água (*I. galbana* T-ISO; *N. oculata*; *Tetraselmis sp.*; *Scenedesmus sp.*; Fig. 16.1).



**Figura 16.1.** Efeito da aplicação de diferentes extractos de microalgas e viabilidade celular da linha celular tumoral, HepG2. Os extractos foram aplicados durante 72 horas a uma concentração de 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e a viabilidade celular determinada através do método de MTT. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 6 replicados. \*DMSO (controlo negativo, 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); \*Etopósido (controlo positivo, 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). O tratamento estatístico foi feito comparando todos os extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

De seguida, os extractos que apresentaram valores de viabilidade celular igual ou inferior a 50% foram testados em concentrações inferiores (3,9; 7,8; 15,6; 31,3; e 62,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) na linha celular HepG2, e também numa linha celular não tumoral (estroma de medula óssea), de modo a avaliar a selectividade dos mesmos. Os resultados foram novamente comparados com o etopósido, aplicado nas mesmas concentrações que os extractos.

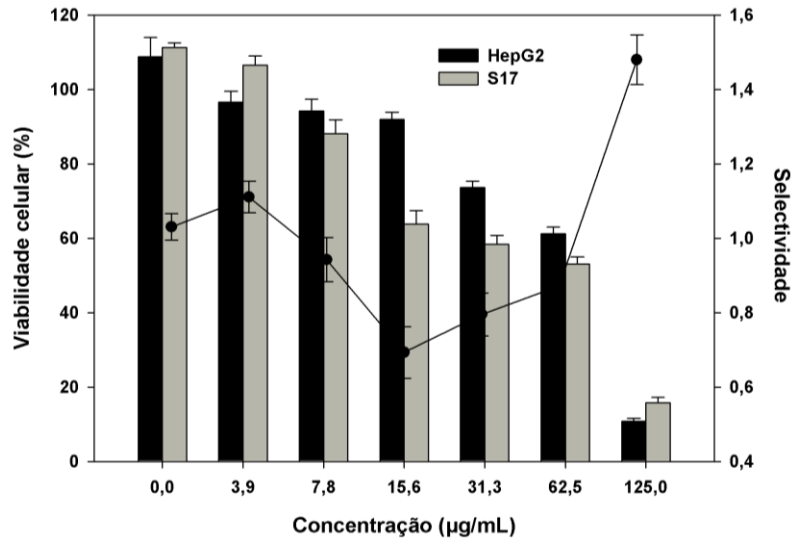
Os extractos com maior actividade antitumoral foram os de hexano das espécies *Tetraselmis sp.* e *Scenedesmus sp.*, com valores de IC<sub>50</sub> na linha celular HepG2 de 58,25 µg/mL e de 93,17 µg/mL, respectivamente (Tabela 5). Os extractos de acetona e de éter da espécie *I. galbana* T-ISO apresentaram igualmente elevada capacidade de redução da viabilidade celular da linha HepG2, com valores de IC<sub>50</sub> de 81,30 µg/mL e de 114,03 µg/mL, respectivamente (Tabela 5). O etopósido apresentou um valor de IC<sub>50</sub> de 1,85 µg/mL na linha celular cancerígena e 0,05 µg/mL na linha celular não tumoral (Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores de IC<sub>50</sub> (µg/mL) dos extractos com actividade antitumoral de diferentes espécies de microalgas, aplicados em duas linhas celulares humanas.

Espécie	Extracto	Linha celular	
		HepG2	S17
<i>I. galbana</i> T-ISO	Éter	114,03 ± 0,99	-
	Acetona	<b>81,30 ± 2,97</b>	-
<i>Tetraselmis sp.</i>	Hexano	<b>58,25 ± 2,79</b>	45,87 ± 1,66
<i>Scenedesmus sp.</i>	Hexano	93,17 ± 2,34	84,33 ± 9,54
Etopósido*		1,85 ± 0,12	0,05 ± 0,01

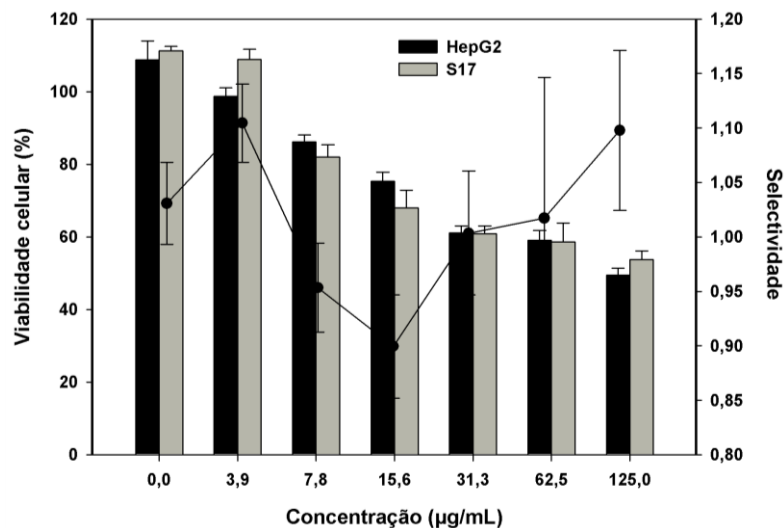
Os valores representam médias ± EP de 6 replicados. \*Etopósido (controlo positivo). HepG2 (linha celular de hepatocarcinoma); S17 (linha celular não tumoral de estroma da medula óssea) - IC<sub>50</sub> não determinado, valores de percentagem de viabilidade celular superiores a 50 % para a maior concentração testada (125 µg/mL).

Relativamente a selectividade dos extractos para a linha celular tumoral verificou-se que o extracto de hexano da espécie *Tetraselmis sp.* na concentração de 125 µg/mL apresentou o maior valor de selectividade (IS=1,48; Fig. 17.2), o que indica que este extracto é selectivo para as HepG2 nesta concentração (IS > 1).



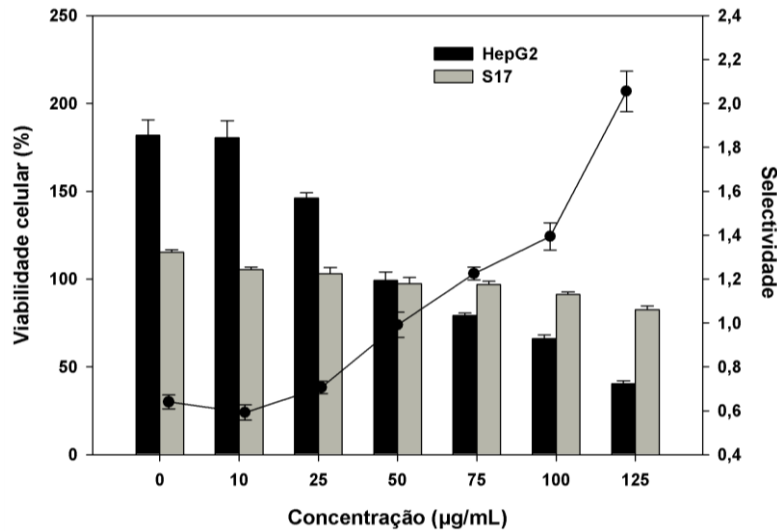
**Figura 17.2.** Viabilidade celular (%; barras) e IS (linha) do extracto de hexano para a espécie *Tetraselmis sp.* As barras negras e cinzentas representam as médias  $\pm$  EP de 6 replicados das linhas celulares do HepG2 (hepatocarcinoma humano) e das S17 (estroma da medula óssea), respectivamente. A linha representa as médias  $\pm$  EP do IS do extracto para a linha celular tumoral (HepG2).

O IS mais elevado no extracto de hexano da espécie *Scenedesmus sp.* foi observada na concentração de 3,9 µg/mL (IS = 1,10; Fig. 18.3). No entanto, este extracto revelou ser também selectivo nas concentrações mais altas, observando-se um aumento dos valores de IS acima da concentração de 31,3 µg/mL (Fig. 18.3).



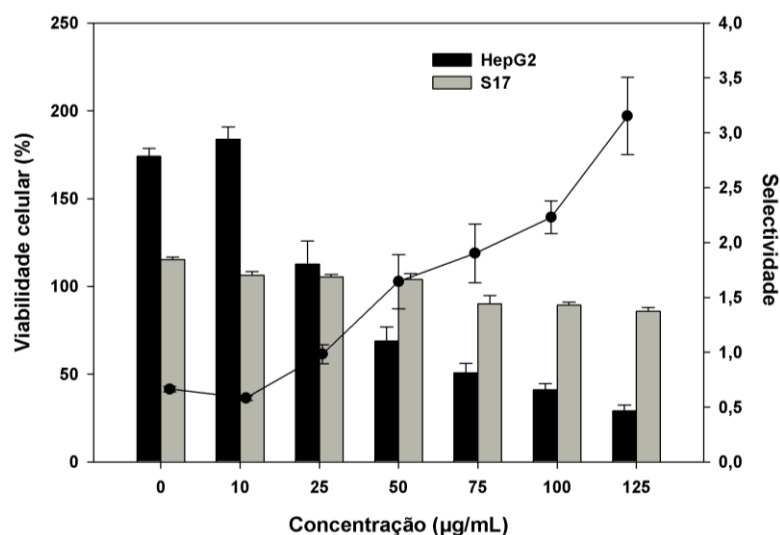
**Figura 18.3.** Viabilidade celular (%; barras) e IS (linha) do extracto de hexano para a espécie *Scenedesmus sp.* As barras negras e cinzentas representam as médias  $\pm$  EP de 6 replicados das linhas celulares, HepG2 (hepatocarcinoma humano) e S17 (estroma da medula óssea), respectivamente. A linha representa as médias  $\pm$  EP do IS do extracto para a linha celular tumoral (HepG2).

No extracto de éter de *I. galbana* T-ISO, foram observados valores de IS superiores a 1 nas concentrações superiores a 75 µg/mL, sendo que o maior valor de selectividade deste extracto foi atingido na concentração 125 µg/mL (2,06; Fig. 19.4).



**Figura 19.4.** Viabilidade celular (%; barras) e IS (linha) do extracto de éter para a espécie *I. galbana* T-ISO. As barras negras e cinzentas representam as médias  $\pm$  EP de 6 replicados das linhas celulares, HepG2 (hepatocarcinoma humano) e S17 (estroma da medula óssea), respectivamente. A linha representa as médias  $\pm$  EP do IS do extracto para a linha celular tumoral (HepG2).

No extracto de acetona da espécie *I. galbana* T-ISO foram observados valores de IS para a linha celular tumoral superiores a 1 nas concentrações superiores a 50 µg/mL (Fig. 20.5). Neste extracto, o valor de selectividade mais elevado foi obtido na concentração 125 µg/mL (IS=3,15; Fig. 20.5).



**Figura 20.5.** Viabilidade celular (%; barras) e IS (linha) do extracto de acetona para a espécie *I. galbana* T-ISO. As barras negras e cinzentas representam as médias  $\pm$  EP de 6 replicados das linhas celulares, HepG2 (hepatocarcinoma humano) e S17 (estroma da medula óssea), respectivamente. A linha representa as médias  $\pm$  EP do IS do extracto para a linha celular tumoral (HepG2).

Comparando os valores obtidos nas linhas celulares tumoral (HepG2) e não tumoral (S17), verificou-se que os extractos de éter e de acetona da espécie *I. galbana* T-ISO, apresentaram os valores mais elevados de selectividade relativamente às células tumorais (Figs. 19.4 e 20.5) o que indica que estes extractos são selectivos para as HepG2 para as condições utilizadas neste trabalho.

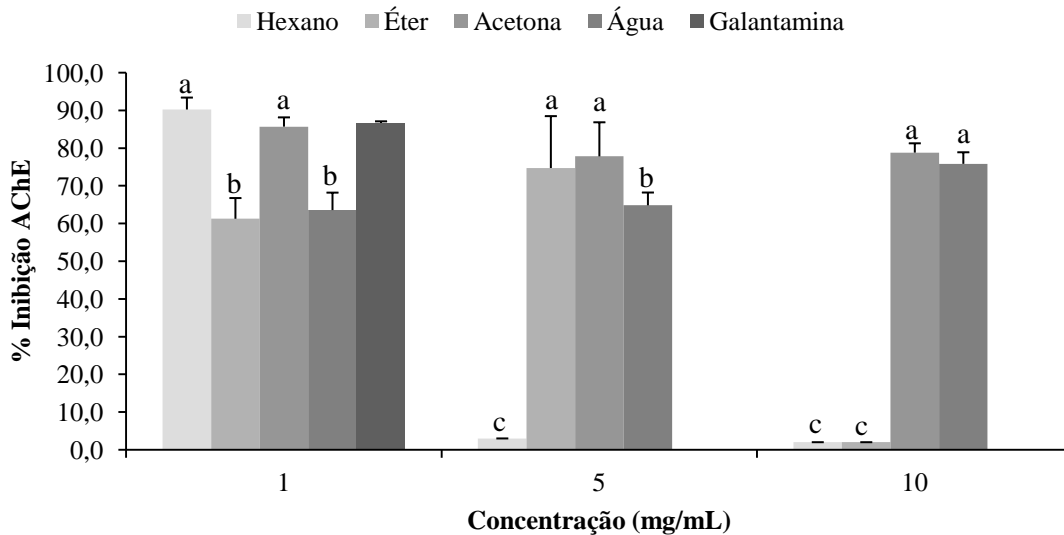
### 3.4. ACTIVIDADE NEUROPROTECTORA

#### 3.4.1. ACTIVIDADE INIBITÓRIA DA AChE

A actividade inibitória da AChE (%) dos diferentes extractos de microalgas foi classificada como elevada (> 50% inibição); moderada (30-50% inibição); baixa (< 30% inibição) e nula (< 5% inibição), de acordo com Vinutha *et al.* (2007).

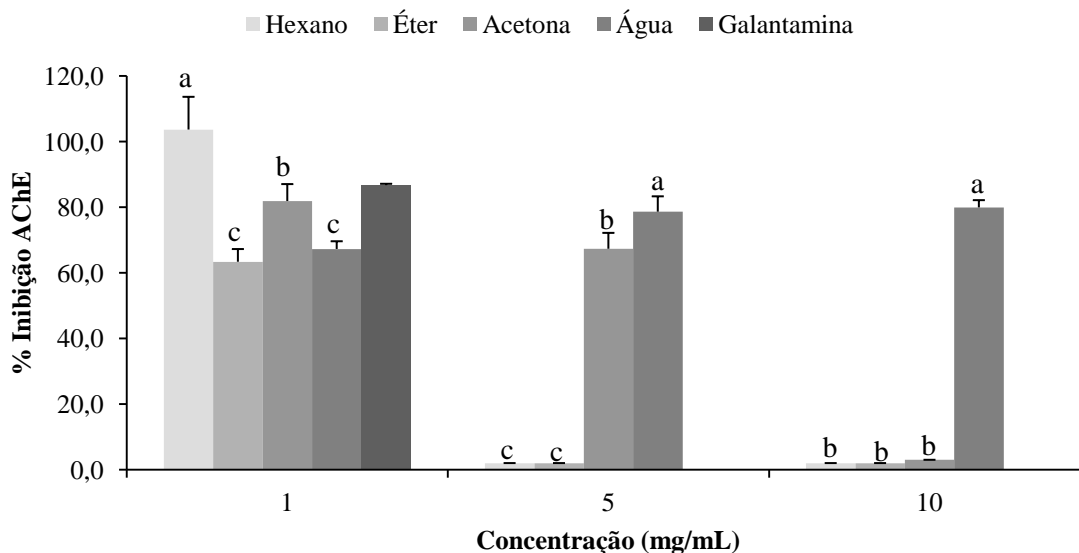
A percentagem de actividade inibitória da AChE dos extractos variou entre 30,37% (*Scenedesmus sp.*; 10 mg/mL) e 103,63% (*I. galbana* T-ISO; 1 mg/mL). Para alguns dos extractos testados em concentrações superiores 1 mg/mL não se verificou aumento de actividade inibitória da AChE (Figs. 21.1-25.5).

Como se pode observar na Fig. 21.1 todos os extractos da espécie *B. braunii* apresentaram elevada actividade inibitória da AChE na concentração de 1 mg/mL.



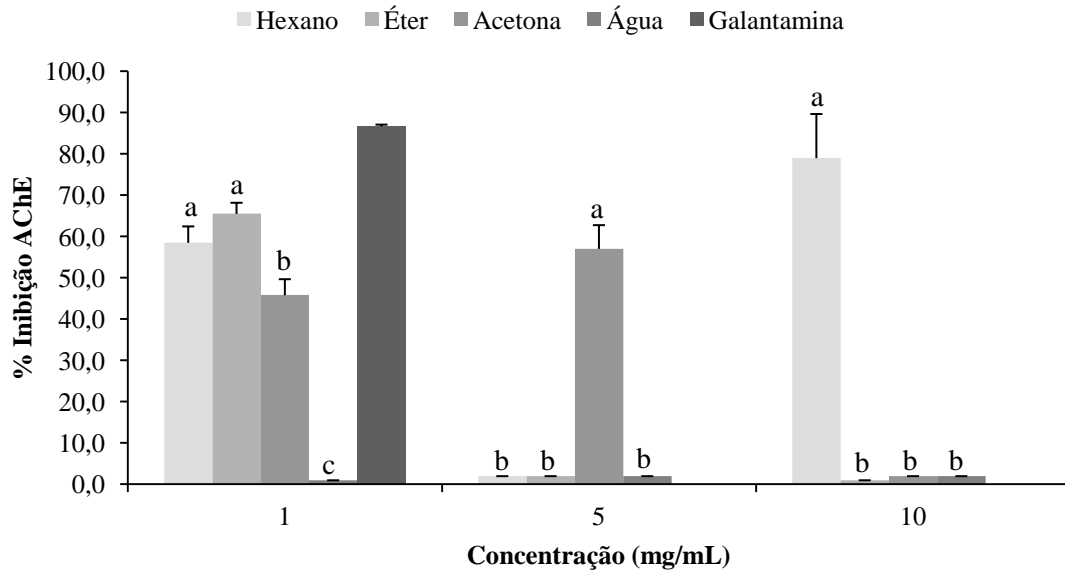
**Figura 21.1.** Actividade inibitória da AChE (%) dos diferentes extractos da microalga *B. braunii*. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 6 replicados. Galantamina (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

O extracto de hexano na concentração de 1 mg/mL da espécie *I. galbana* T-ISO foi o que apresentou o valor mais elevado de inibição da AChE (Fig. 22.2).



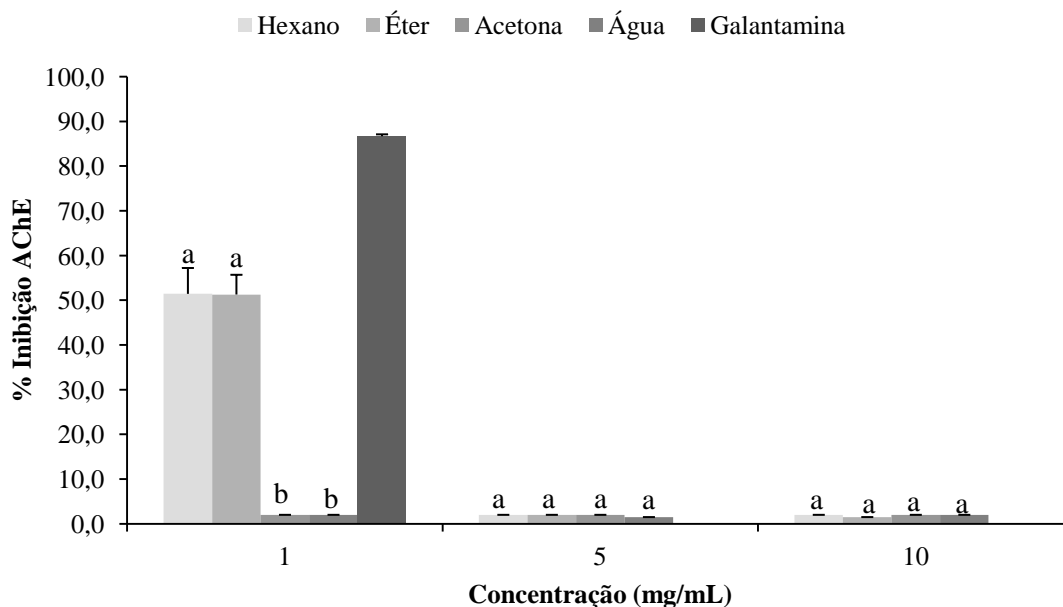
**Figura 22.2.** Actividade inibitória da AChE (%) dos diferentes extractos da microalga *I. galbana* T-ISO. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 6 replicados. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. Galantamina (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Para espécie *N. oculata* o valor mais elevado de actividade inibitória da AChE (%) foi registado no extracto de hexano (10 mg/mL; Fig. 23.3).



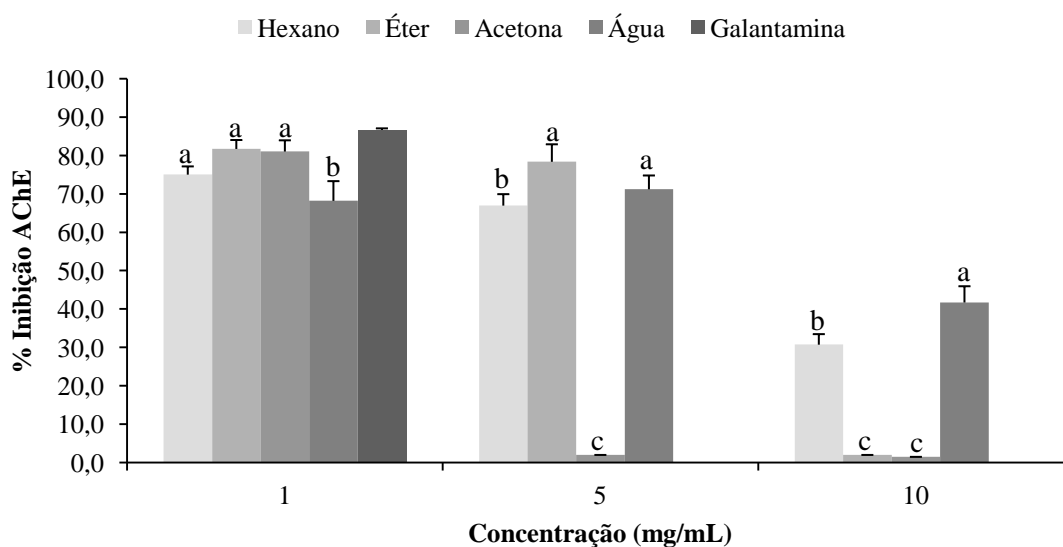
**Figura 23.3.** Actividade inibitória da AChE (%) dos diferentes extractos da microalga *N. oculata*. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. Galantamina (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Dos diversos extractos analisados da espécie *Tetraselmis sp.* apenas os extractos de hexano e de éter apresentaram actividade inibitória da AChE (Fig. 24.4).



**Figura 24.4.** Actividade inibitória da AChE (%) dos diferentes extractos da microalga *Tetraselmis sp.* Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. Galantamina (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

No caso da espécie *Scenedesmus sp.* todos os extractos na menor concentração testadas apresentaram elevada actividade inibitória da AChE (Fig. 25.5).



**Figura 25.5.** Actividade inibitória da AChE (%) dos diferentes extractos da microalga *Scenedesmus sp.* Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. Galantamina (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Nos extractos de hexano (1 mg/mL) provenientes das espécies *B. braunii* (90,23%) e *I. galbana* T-ISO (103,63%) foram registados valores de actividade inibitória da AChE superiores ao do controlo positivo (86,68%;  $p < 0,05$ ; Figs. 21.1 e 22.2). As espécies apresentaram baixos valores de IC<sub>50</sub>, sendo que o menor valor foi observado no extracto de acetona (0,05 mg/mL) da microalga *B. braunii*, o qual foi inferior ao do controlo positivo (0,14 mg/mL; Tabela 6).

**Tabela 6.** Actividade inibitória da AChE (IC<sub>50</sub>, mg/mL) dos diferentes extractos de microalgas.

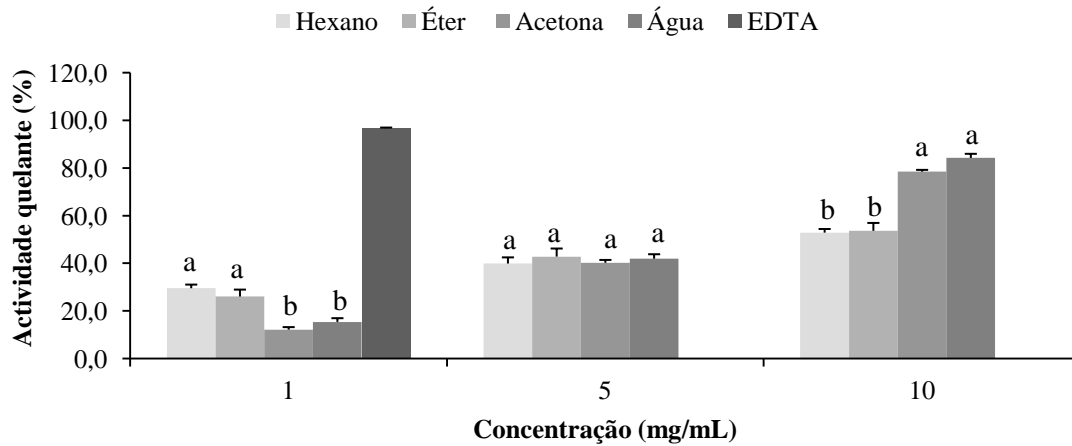
Espécies	Hexano	Éter	Acetona	Água
<i>B. braunii</i>	0,39 ± 0,06b	0,69 ± 0,17a	<b>0,05 ± 0,01b</b>	<b>0,12 ± 0,05ab</b>
<i>I. galbana</i> T-ISO	0,32 ± 0,02b	0,30 ± 0,01bc	0,56 ± 0,04ab	<b>0,16 ± 0,03a</b>
<i>N. oculata</i>	0,84 ± 0,06a	0,49 ± 0,02ab	1,53 ± 0,82a	-
<i>Tetraselmis</i> sp.	0,71 ± 0,06a	0,71 ± 0,08a	-	-
<i>Scenedesmus</i> sp.	0,32 ± 0,02b	<b>0,15 ± 0,01c</b>	0,22 ± 0,02ab	<b>0,11 ± 0,05ab</b>
Galantamina*		0,14 ± 0,03		

Os valores representam médias ± EP de 6 replicados. \* Galantamina (controlo positivo). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes espécies com o mesmo extracto. Os valores seguidos com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ). - IC<sub>50</sub> não determinado.

### 3.4.2. ACTIVIDADE QUELANTE DE Fe<sup>2+</sup>

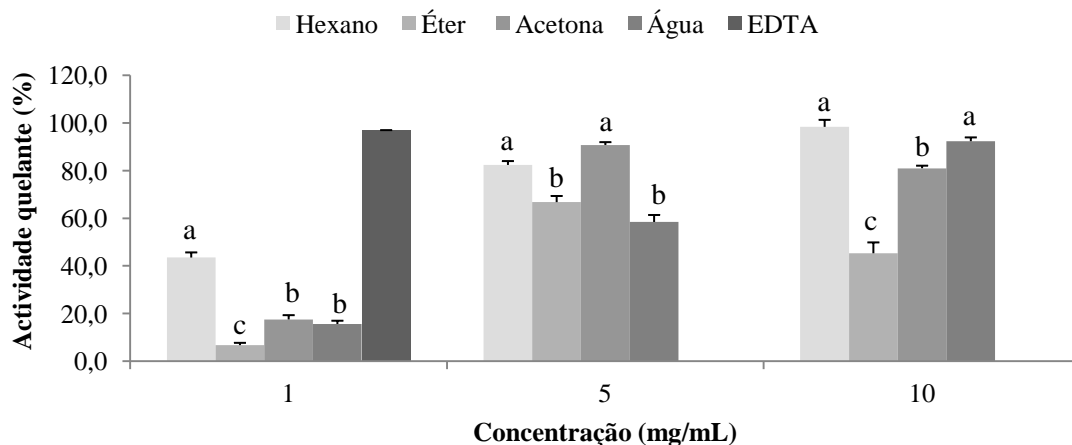
Para este estudo foram testados diversos extractos de microalgas para pesquisa de compostos bioactivos com potencial actividade neuroprotectora, através da análise da actividade quelante do ião metálico Fe<sup>2+</sup>. De um modo geral a actividade quelante dos diversos extractos para o Fe<sup>2+</sup> apresentou diferenças significativas para as concentrações analisadas ( $p < 0,05$ ; Figs. 26.1-30.5). A percentagem de actividade quelante variou entre 5,06% (éter; 1 mg/mL; *N. oculata*) e 135,47% (acetona; 10 mg/mL; *Tetraselmis* sp.).

O valor mais elevado de actividade quelante para a espécie *B. braunii* foi obtida no extracto de água, como mostra a Fig. 26.1.



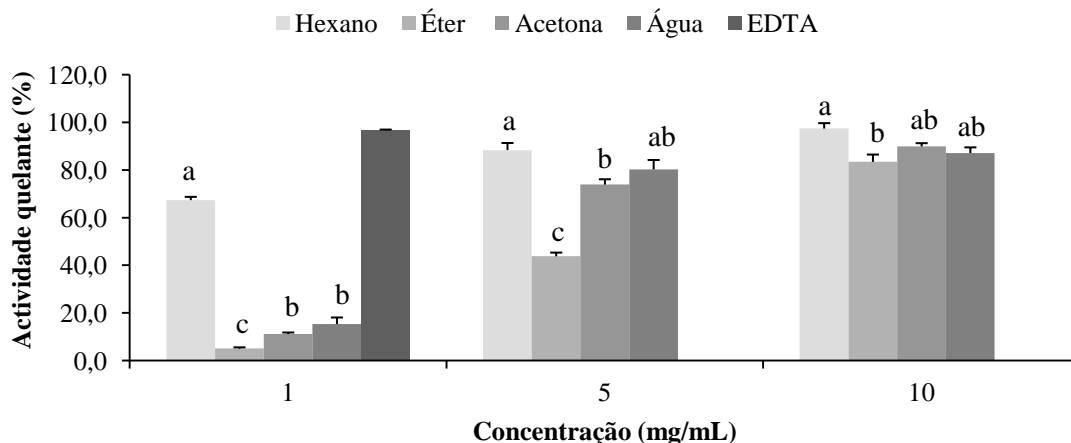
**Figura 26.1.** Actividade quelante (%) de Fe<sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga *B. braunii*. Os valores representam médias ± EP de 9 replicados. EDTA (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Na espécie *I. galbana* T-ISO os valores mais elevados de actividade quelante foram observados nos extractos de hexano (98,34%; 10 mg/mL), de acetona (90,7%; 5 mg/mL) e de água (92,32%; 10 mg/mL; Fig. 27.2).



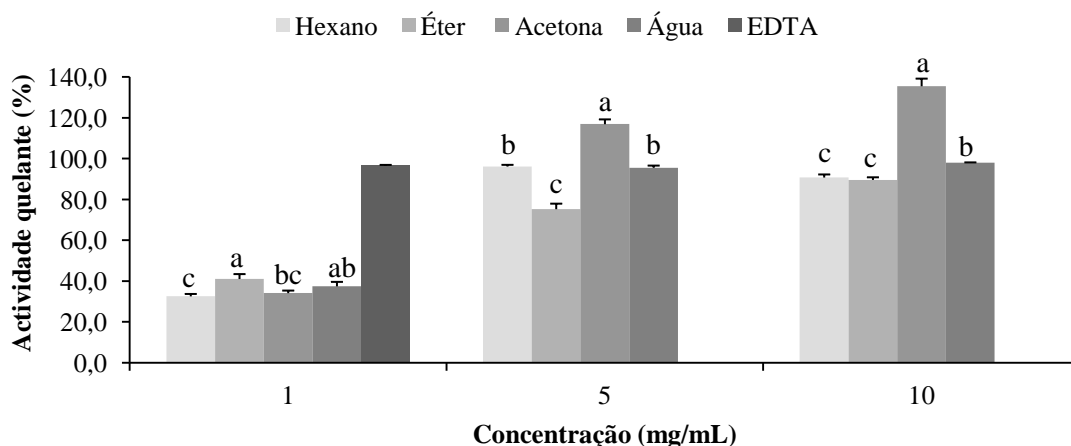
**Figura 27.2.** Actividade quelante (%) de Fe<sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga *I. galbana* T-ISO. Os valores representam médias ± EP de 9 replicados. EDTA (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

O extracto de hexano da espécie *N. oculata* apresentou a actividade quelante mais elevada (Fig. 28.3) em todas as concentrações testadas.



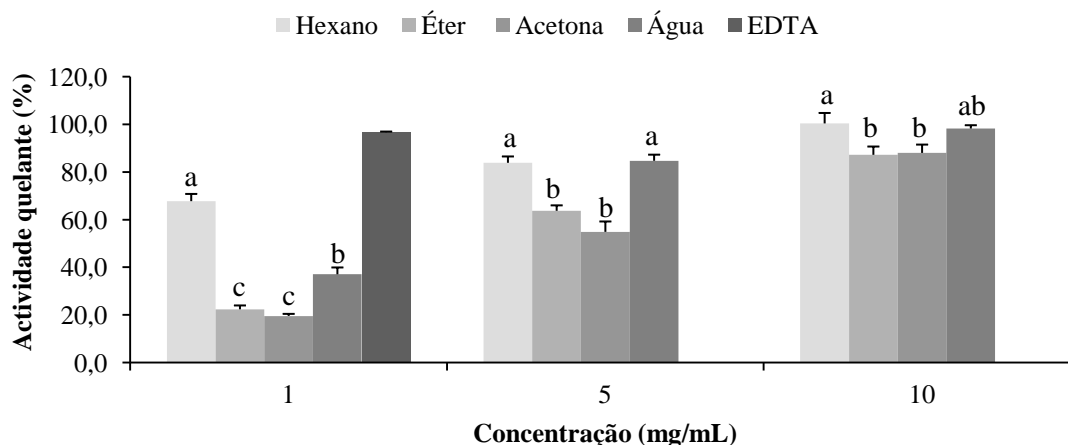
**Figura 28.3.** Actividade quelante (%) de Fe<sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga *N. oculata*. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. EDTA (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Na espécie *Tetraselmis sp.* o valor mais elevado de actividade quelante foi registada no extracto de acetona nas concentrações e 5 e 10 mg/mL (Fig. 29.4).



**Figura 29.4.** Actividade quelante (%) de Fe<sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga *Tetraselmis sp.* Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. EDTA (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Finalmente, na espécie *Scenedesmus sp.* verificou-se que o extracto de hexano foi a que apresentou a melhor actividade quelante contra o Fe<sup>2+</sup>, como mostra a Fig. 30.5.



**Figura 30.5.** Actividade quelante (%) de Fe<sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga *Scenedesmus sp.* Os valores representam médias ± EP de 9 replicados. EDTA (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Em todas as espécies analisadas foram observados extractos com valores elevados de actividade quelante, e os valores de IC<sub>50</sub> variaram entre 0,70 mg/mL (*N. oculata*; hexano) e 9,25 mg/mL (*B. braunii*; hexano; Tabela 7). Os extractos de hexano das espécies *N. oculata* e *Scenedesmus sp.* foram os mais bioactivos com valores de IC<sub>50</sub> de 0,70 mg/mL e 0,73 mg/mL, respectivamente (Tabela 7).

**Tabela 7.** Actividade quelante de Fe<sup>2+</sup> (IC<sub>50</sub>, mg/mL) dos diferentes extractos de microalgas.

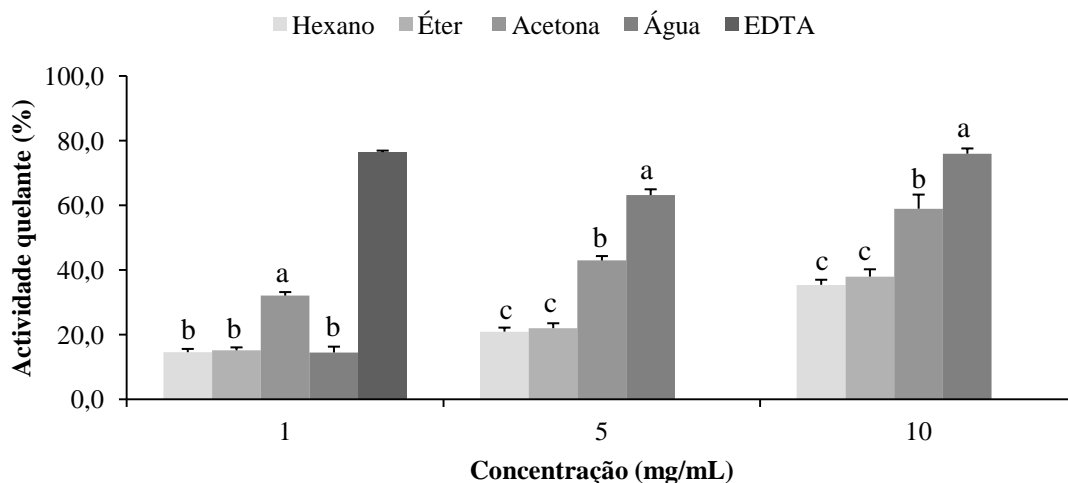
Espécies	Hexano	Éter	Acetona	Água
<i>B. braunii</i>	9,25 ± 0,23a	8,57 ± 2,95a	7,42 ± 0,23a	5,44 ± 0,03a
<i>I. galbana</i> T-ISO	1,29 ± 0,03bc	2,67 ± 0,07b	1,86 ± 0,15d	3,61 ± 0,19b
<i>N. oculata</i>	<b>0,70</b> ± 0,03c	5,04 ± 0,26ab	2,70 ± 0,14c	2,53 ± 0,14c
<i>Tetraselmis sp.</i>	1,71 ± 0,15b	1,73 ± 0,18b	1,41 ± 0,17d	1,91 ± 0,18cd
<i>Scenedesmus sp.</i>	<b>0,73</b> ± 0,02c	2,84 ± 0,29b	4,11 ± 0,14b	1,64 ± 0,02d
EDTA*		0,10 ± 0,00		

Os valores representam médias ± EP de 9 replicados. \*EDTA (controlo positivo). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes espécies com o mesmo extracto. Os valores seguidos com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

### 3.4.3. ACTIVIDADE QUELANTE DE $\text{Cu}^{2+}$

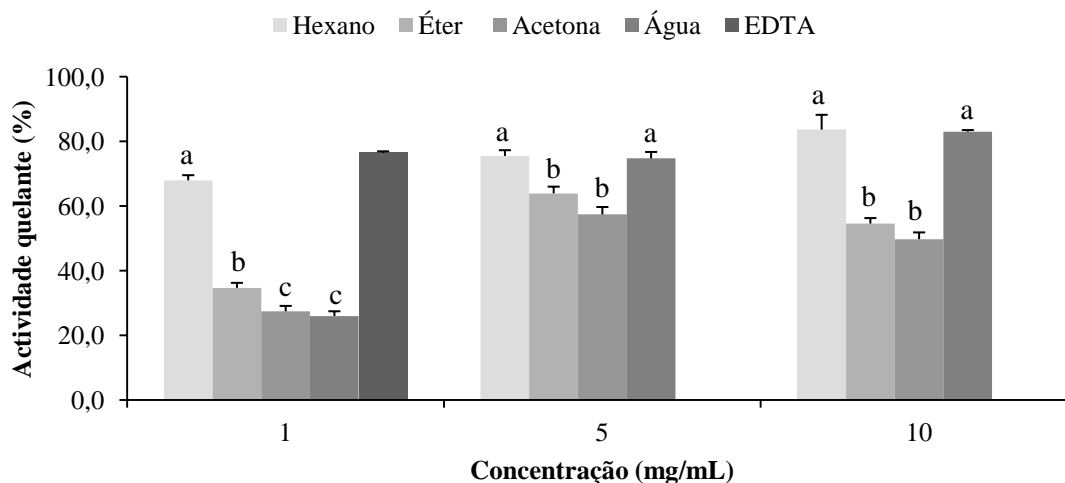
Foram observadas diferenças significativas de actividade quelante do  $\text{Cu}^{2+}$  entre as três concentrações testadas ( $p < 0,05$ ; Figs. 31.1-35.5), tendo os valores variando entre 12,84% (acetona; 1 mg/mL; *Scenedesmus sp.*) e 83,64 % (hexano; 10 mg/mL; *Scenedesmus sp.*; Fig. 35.5). Nas espécies, *I. galbana* T-ISO e *Scenedesmus sp.* (éter e acetona), *N. oculata* (éter) e *Tetraselmis sp.* (acetona) observou-se uma diminuição da actividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  com o aumento da concentração de 5 para 10 mg/mL (Figs. 32.2-35.5).

Como mostra a Fig. 31.1 o extracto de água apresentou o valor mais alto de actividade quelante contra o  $\text{Cu}^{2+}$  na espécie *B. braunii*.



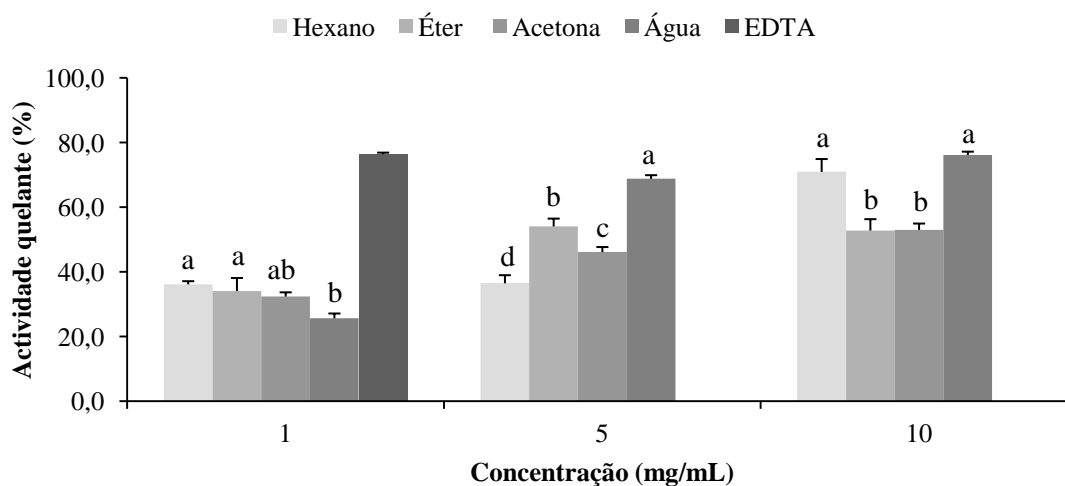
**Figura 31.1.** Actividade quelante (%) de  $\text{Cu}^{2+}$  dos diferentes extractos da microalga *B. braunii*. Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. EDTA (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Relativamente a microalga *I. galbana* T-ISO, os extractos de hexano e de água foram os mais bioactivos com valores de actividade quelante superior a do controlo positivo, EDTA (Fig. 32.2).



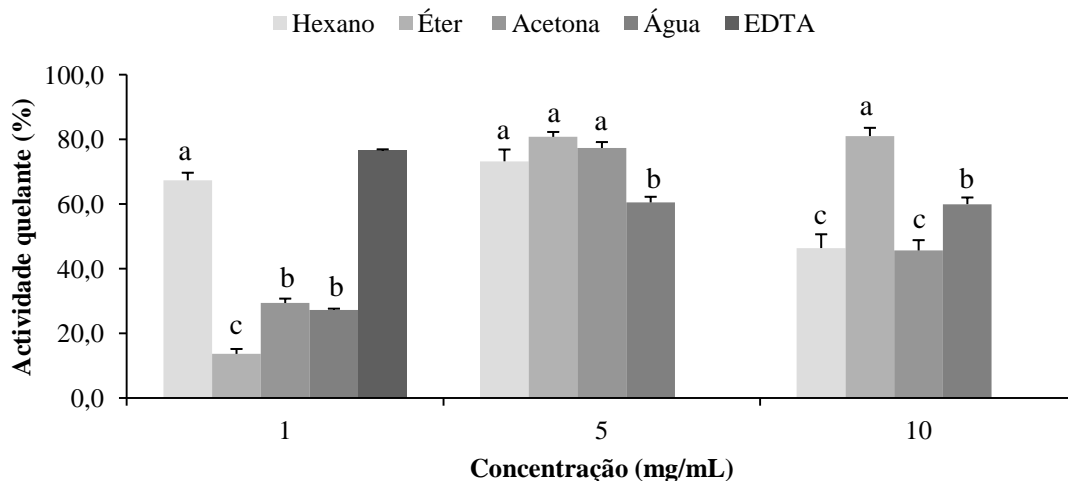
**Figura 32.2.** Actividade quelante (%) de Cu<sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga *I. galbana* T-ISO. Os valores representam médias ± EP de 9 replicados. EDTA (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Os extractos de hexano e de água foram os que apresentaram os valores mais elevados de actividade quelante na microalga *N. oculata* (Fig. 33.3).



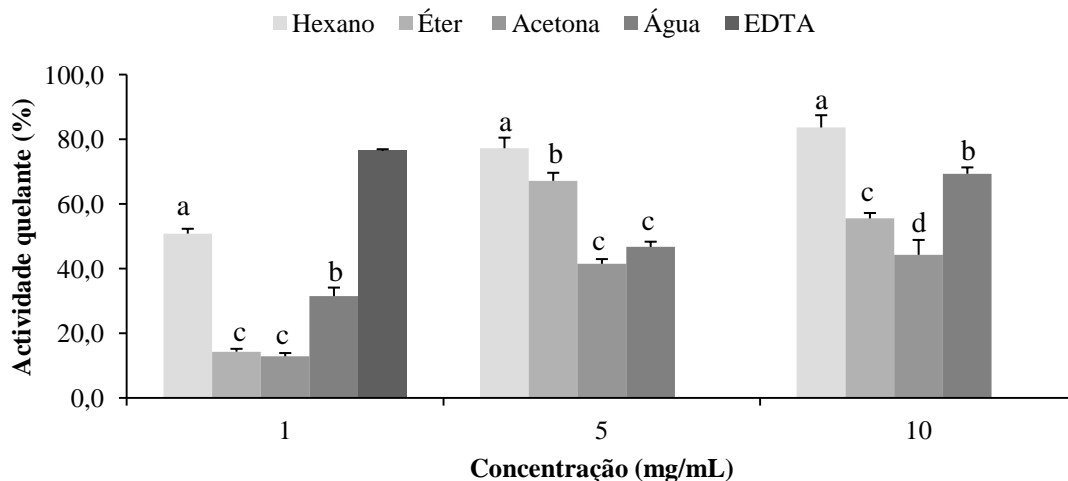
**Figura 33.3.** Actividade quelante (%) de Cu<sup>2+</sup> dos diferentes extractos da microalga *N. oculata*. Os valores representam médias ± EP de 9 replicados. EDTA (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Para a espécie *Tetraselmis sp.* os extractos com maior bioactividade foram os de hexano, éter e de acetona (Fig. 34.4).



**Figura 34.4.** Actividade quelante (%) de  $\text{Cu}^{2+}$  dos diferentes extractos da microalga *Tetraselmis sp.* Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. EDTA (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

O extracto de hexano apresentou elevada actividade quelante em todas as concentrações testadas para a microalga *Scenedesmus sp.* (Fig. 35.5).



**Figura 35.5.** Actividade quelante (%) de  $\text{Cu}^{2+}$  dos diferentes extractos da microalga *Scenedesmus sp.* Os valores representam médias  $\pm$  EP de 9 replicados. EDTA (controlo positivo, 1 mg/mL). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes extractos com a mesma concentração. Colunas com letras iguais não apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

Os extractos mais bioactivos foram os da espécie *I. galbana* T-ISO (hexano:  $\text{IC}_{50} = 0,90$  mg/mL), *Tetraselmis sp.* (hexano:  $\text{IC}_{50} = 0,99$  mg/mL) e *Scenedesmus sp.* (hexano:  $\text{IC}_{50}$

= 0,91 mg/mL), sendo estes os valores mais baixos registados em todas as espécies analisadas (Tabela 8).

**Tabela 8.** Actividade quelante de Cu<sup>2+</sup> (IC<sub>50</sub>, mg/mL) de diferentes extractos de microalgas.

Espécies	Hexano	Éter	Acetona	Água
<i>B. braunii</i>	-	-	nd	3,73 ± 0,17b
<i>I. galbana</i> T-ISO	0,90 ± 0,09b	1,81 ± 0,05c	3,53 ± 0,02b	2,42 ± 0,14d
<i>N. oculata</i>	5,99 ± 0,30a	3,52 ± 1,06a	5,42 ± 0,29a	3,23 ± 0,06bc
<i>Tetraselmis</i> sp.	0,99 ± 0,07b	2,52 ± 0,15b	2,10 ± 0,04c	2,96 ± 0,10c
<i>Scenedesmus</i> sp.	0,91 ± 0,12b	2,06 ± 0,04b	-	5,49 ± 0,14a
EDTA*		0,28 ± 0,01		

Os valores representam médias ± EP de 9 replicados. \*EDTA (controlo positivo). O tratamento estatístico foi feito entre diferentes espécies com o mesmo extracto. Os valores seguidos com letras diferentes apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).- IC<sub>50</sub> não calculado pois a actividade quelante não chegou a 50% com as concentrações testadas; nd IC<sub>50</sub> não determinado para o extracto, devido a insuficiência de dados.

A Tabela 9 mostra os extractos mais bioactivos e as respectivas actividades biológicas nos diferentes ensaios realizados com as diversas espécies de microalgas.

**Tabela 9.** Extractos mais bioactivos das diferentes espécies de microalgas analisadas.

Espécies	Extractos	Actividades biológicas		
		Antioxidante	Antitumoral	Neuroprotectora
<i>B. braunii</i>	Hexano			<sup>1</sup> <sub>+</sub>
	Hexano			<sup>1</sup> <sub>+</sub> <sup>3</sup> <sub>+</sub>
<i>I. galbana</i> T-ISO	Éter		+	<sup>1</sup> <sub>+</sub>
	Acetona	+	+	
<i>N. oculata</i>	Hexano			<sup>2</sup> <sub>+</sub>
<i>Tetraselmis</i> sp.	Hexano	+	+	<sup>3</sup> <sub>+</sub>
	Éter	+		
<i>Scenedesmus</i> sp.	Hexano		+	<sup>1</sup> <sub>+</sub> <sup>2</sup> <sub>+</sub> <sup>3</sup> <sub>+</sub>
	Éter			<sup>1</sup> <sub>+</sub>

<sup>1</sup> Actividade inibitória da AChE

<sup>2</sup> Actividade quelante para o Fe<sup>2+</sup>

<sup>3</sup> Actividade quelante para o Cu<sup>2+</sup>

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

Neste trabalho foram utilizados dois métodos de determinação de actividade antioxidante: o método de DPPH e o de ABTS. Ambos consistem na medição da capacidade de captação/neutralização de radicais livres.

Com o método do DPPH, a espécie *I. galbana* T-ISO foi uma das espécies onde se registou extractos (éter; 10 mg/mL e acetona; 5 mg/mL) com valores de actividade de *scavenging* do radical DPPH<sup>·</sup> superiores ao do controlo positivo (Fig. 6.2). As substâncias antioxidantes extraídas com estes solventes (éter e acetona) são constituídas bioquimicamente por compostos de baixa polaridade a polaridade média. Compostos da espécie *I. galbana* T-ISO de polaridade média (extraídos com acetona) apresentaram maior actividade antioxidante, revelando valor mais baixo de IC<sub>50</sub> (Tabela 5). A espécie *I. galbana* é uma microalga rica em proteínas, glúcidos e lípidos, e constitui uma potencial fonte de compostos antioxidantes naturais com elevado valor nutritivo (Conner e Neuringer, 1987; Mohd *et al.*, 2007). Para além desta espécie, também os extractos de hexano e éter da espécie *Tetraselmis sp.* e de acetona da *Scenedesmus sp.* e *B. braunii* apresentaram valores elevados de actividade antioxidante (Figs. 6.4-6.5, 6.1).

Nos extractos considerados menos polares (hexano e éter), a actividade antioxidante também pode estar relacionada com a presença de diferentes lípidos (Plaza *et al.*, 2009).

Neste trabalho, não foram obtidos valores de IC<sub>50</sub> para os diferentes extractos testados (no ensaio de DPPH) semelhantes ou inferiores ao do BHT. Contudo, há que ter em conta que estes extractos crus têm na sua composição compostos antioxidantes e outros potencialmente não-antioxidante.

Em relação ao método de ABTS constatou-se que os extractos mais bioactivos foram os de acetona e de água em todas as espécies analisadas. Isto mostra que estas espécies podem conter compostos antioxidantes de polaridade média a polares. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por outros autores (Natrah *et al.*, 2007), onde foi observado que os extractos provenientes de diversas microalgas, nomeadamente *I. galbana*, *Nannochloropsis oculata*, *Tetraselmis sp.* e *Scenedesmus sp.* apresentaram elevada actividade antioxidante.

Todos os extractos analisados com estes dois métodos apresentaram considerável actividade antioxidante. Os resultados deste estudo indicam que estas espécies de microalgas são constituídas por compostos antioxidantes de polaridades diferentes.

#### 4.2. ACTIVIDADE ANTITUMORAL

A actividade antitumoral dos extractos das espécies de microalgas em estudo foi avaliada *in vitro* na linha celular HepG2, através do método colorimétrico de MTT. Este método baseia-se na capacidade das células vivas reduzirem o brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il) -2,5-difenil-tetrazólio em sais de formazão (Mosmann, 1983). A redução do MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da acção da enzima succinato desidrogenase, fornecendo então uma medida da função mitocondrial. Assim, quanto menor a viabilidade, menor a quantidade de sais de formazão formado, o que resulta numa menor absorvância.

Os melhores resultados foram obtidos nas espécies *Tetraselmis sp.* (hexano), *Scenedesmus sp.*, (hexano) e *Isochrysis galbana* T-ISO (éter e acetona) na concentração de 125 µg/ml, onde foi evidente uma redução drástica da viabilidade celular. Estes serão, portanto, os extractos mais adequados à pesquisa de compostos anticancerígenos uma vez que reduziram a viabilidade celular destas células de hepatocarcinoma humano. Assim, ao testar estes extractos numa linha celular não-tumoral (S17), os extractos de éter e de acetona da espécie *I. galbana* T-ISO apresentaram comportamento de carácter mais selectivo de redução da viabilidade celular das células HepG2, comparativamente com a linha celular não-tumoral. Além disso, este comportamento selectivo não se verificou com o controlo positivo (etopósido) indutor de morte de células tumorais (Fig. 16.1). O etopósido é um dos compostos mais potentes utilizado no tratamento de vários tipos de cancro como o dos testículos e dos ovários (Hande, 1998). Neste estudo, o etopósido revelou não ser selectivo para as HepG2 em relação às células não-tumorais, mas os extractos da espécie *I. galbana* T-ISO, principalmente os extractos de éter e de acetona, apresentaram elevados índices de selectividade para as HepG2. No entanto, são descritas diferentes níveis de sucesso com este medicamento no tratamento de diferentes tipos de cancro. Segundo Miao *et al.* (2003) existe alguma resistência das células do hepatocarcinoma *in vitro* para este composto. Para além disso, a linha celular HepG2 é conhecida por ter propriedades resistentes a medicamentos e toxinas (Liu *et al.*, 2010).

Nos extractos menos polares (hexano e éter), a actividade anticancerígena poderá dever-se à presença de ácidos gordos de cadeia ómega-3 presentes no perfil de microalgas marinhas, nomeadamente EPA e DHA. Ambos os compostos demonstraram capacidade de reduzir o crescimento de diferentes tipos de tumores em murganho (Field e Schley, 2004), nomeadamente em tumores hepáticos (Calviello *et al.*, 1998). Todas as espécies utilizadas neste trabalho foram previamente analisadas por cromatografia gasosa com espectrometria de massa no laboratório de Biotecnologia Marinha (MarBiotech, CCMAR). Estes estudos prévios indicaram que todas as espécies testadas que apresentam actividade antitumoral têm no seu perfil elevadas concentrações de ácido linoleico (*Tetraselmis sp.*, 21,4%; *I. galbana* T-ISO, 12,1%; *Scenedesmus sp.*, 10,3%). O ácido linoleico é também considerado um composto com forte actividade anticancerígena, capaz de reduzir a incidência, progressão e número de metástase de tumores em murganho (Eynard e Lopez, 2003). A espécie *Isochrysis sp.* apresenta ainda uma elevada concentração de DHA (12,8%) e a *Tetraselmis* usada neste trabalho tem um conteúdo de EPA significativo (10%). Os extractos de acetona são constituídos normalmente por pigmentos, principalmente carotenóides. Como o extracto de acetona da *I. galbana* T-ISO foi o que revelou maior actividade antitumoral, esta actividade pode ser devido à presença destes compostos, uma vez que são considerados por diversos autores, como agentes de prevenção do cancro (van Poppel, 1993).

Rosa *et al.* (2005) no estudo realizado com três espécies de microalgas (*Chlorella minutissima*, *Haematococcus pluvialis* e *T. suecica*), utilizando vários extractos (metanol, clorofórmio, acetona e hexano), concluíram que estas espécies apresentam actividade citotóxica em algumas linhas celulares cancerígenas, demonstrando uma vez mais a potencialidade das microalgas para pesquisa de agentes com potencial actividade antitumoral. Neste estudo, os extractos com maior citotoxicidade foram os mais polares (metanol, clorofórmio) e os menos bioactivos foram os de acetona e de hexano (menos polares). No entanto, no presente estudo os extractos com maior actividade antitumoral foram provenientes de compostos pouco polares (hexano, éter e acetona). Porém, há que ter em consideração que as condições utilizadas no trabalho de Rosa *et al.* (2005) diferiram das usadas no presente trabalho, nomeadamente ao nível das linhas celulares e tempo de incubação testado.

Uma vez que vários extractos apresentaram actividade citotóxica para as células tumorais testadas, deve-se realizar estudos *in vivo* com estes extractos na aquacultura, de

forma a avaliar o uso ou limitação destas nesta actividade de cultivo, visto que as microalgas são muito usadas neste sector como fonte de nutrientes essenciais para as espécies de cultivo. No entanto, os extractos menos citotóxicas como foi o caso das espécies *B. braunii* e da *N. oculata* poderão ser os mais indicados para uso na aquacultura sendo que esta característica pode ser considerada como a parte benéfica dos compostos menos tóxicos nestas condições de estudo.

### 4.3. ACTIVIDADE NEUROPROTECTORA

#### 4.3.1. ACTIVIDADE INIBITÓRIA DA AChE

Os danos oxidativos causados por espécies reactivas de oxigénio nas várias regiões cerebrais poderão estar associados a longo prazo com anomalias morfológicas, bem como com a perda da memória (Tuzcu e Baydas, 2006). A AD é a principal causa da demência na população idosa. A acumulação de placas  $\beta$ -amilóide, a formação de emaranhados de neurofibrilas, e a perda sináptica e neuronal significativa em áreas crítica do cérebro são considerados como as principais alterações neurológicas associadas a esta doença (García-Ayllón *et al.*, 2010). A enzima AChE tem sido apontada como a principal responsável pela inactivação da neurotransmissão colinérgica. Este processo de neurotransmissão é afectado no cérebro dos pacientes com AD pela acção desta enzima (Davies e Maloney, 1976; Perry *et al.*, 1977), e a diminuição na neurotransmissão colinérgica (provocada pela acção da AChE) observada em pacientes com esta doença contribui para o deficit cognitivo e distúrbios comportamentais associados a esta doença (Ballard *et al.*, 2005).

Neste estudo foi avaliada a capacidade de inibição da AChE com aplicação de diversos extractos de microalgas a concentrações diferentes. Das análises efectuadas, foi na menor concentração que se registaram extractos com valores mais elevados de actividade inibitória da AChE.

O extracto de acetona ( $IC_{50} = 0,05$  mg/mL) da espécie *B. braunii* revelou ser a mais bioactiva, com um valor de  $IC_{50}$  inferior a do controlo positivo (0,14 mg/mL). A *B. braunii* é uma espécie constituída por elevada concentração de hidrocarbonetos e carotenóides (Banerjee *et al.*, 2002; Samori *et al.*, 2010). Os extractos das espécies *B. braunii* (água; 0,12 mg/mL), *I. galbana* T-ISO (água; 0,16 mg/mL) e *Scenedesmus sp.* (água; 0,11 mg/mL; éter; 0,15 mg/mL) apresentaram também elevada actividade inibitória da AChE ( $IC_{50}$ ). A espécie

*Scenedesmus sp.* é composta quimicamente por elevada quantidade de ácidos gordos (19,6 - 21,1%; Mata *et al.*, 2010) e carotenóides (Chu *et al.*, 2011). Igualmente, a espécie *I. galbana* T-ISO contém diferentes tipos de ácidos gordos como o DHA (Kiffe *et al.*, 1995) e EPA (Lopez *et al.*, 1992). Estes extractos poderão conter compostos bioactivos com possível valor terapêutico na prevenção e tratamento de doenças neurodegenerativas, como a do Alzheimer.

Existem poucos trabalhos referentes a determinação de actividade da AChE de diferentes espécies de microalgas. Contudo, estudos feitos com extractos de hexano das microalgas *C. minutissima*, *T. chuii* e *Rhodomonas salina* (Custódio *et al.*, 2012) revelaram actividade inibitória semelhante aos obtidos no presente estudo, como valores de actividade superiores a 80%. A inibição da AChE é considerada um meio promissor para o tratamento terapêutico de várias doenças tais como, a doença do Alzheimer, Parkinson, glaucoma entre outras (Pulok *et al.*, 2007). Deste modo, todos estes extractos bioactivos analisados podem ser considerados como fontes de potenciais compostos para a inibição da AChE, e poderão ser usadas para pesquisa de compostos para tratamento de doenças associadas a distúrbios na neurotransmissão colinérgica.

#### 4.3.2. ACTIVIDADE QUELANTE ( $Fe^{2+}$ E $Cu^{2+}$ )

O ferro e cobre são dois constituintes químicos importantes no funcionamento normal dos organismos. O excesso de ferro no organismo, principalmente na região cerebral, está associado ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas tais como PD (Dexter *et al.*, 1987; Riederer *et al.*, 1989; Connor *et al.*, 1992) e AD (Connor *et al.*, 1992; Qian e Wang, 1998; Thompson *et al.*, 2003). Relativamente ao cobre, sua acumulação no líquido cerebrospinal pode provocar a AD e muitas outras doenças neurológicas (Roos *et al.*, 2006).

Neste estudo foi avaliada a actividade quelante dos iões metálicos  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ , de vários extractos de diferentes espécies de microalgas. Através da análise dos resultados constatou-se que todas as espécies apresentaram actividade quelante nos diversos extractos e concentrações testadas. Os extractos mais bioactivos foram os de hexano das espécies *N. oculata* e *Scenedesmus sp.* (Fig. 28.3, 30.5; Tabela 7). Em relação a actividade quelante contra o  $Cu^{2+}$  as espécies *I. galbana* T-ISO, *Tetraselmis sp.* e *Scenedesmus sp.* revelaram os valores mais elevados, principalmente os de hexano (Figs. 32.2; 34.4-35.5). Os extractos de

éter (*I. galbana* T-ISO) e de acetona (*Tetraselmis sp.*) também apresentaram elevados valores de actividade quelante de  $\text{Cu}^{2+}$  (Figs. 32.2 e 34.4). Os extractos de microalgas são constituídos por uma mistura de vários compostos com comportamentos químicos diferentes (Suganthi *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos com a espécie *N. oculata* indicam que o extracto de hexano exibiu um valor de actividade quelante para o  $\text{Fe}^{2+}$  na concentração de 1 mg/mL (67,3%) diferente a dos obtidos (97,5%) por Custódio *et al.* (2012). A espécie *Tetraselmis sp.* também apresentou um valor menor de actividade quelante para o  $\text{Fe}^{2+}$  (32,6%) das que foram obtidas no extracto de hexano em relação à espécie *T.chuii* (77,8%) para a mesma concentração (1 mg/mL; Custódio *et al.*, 2012). No entanto, relativamente à actividade quelante do  $\text{Cu}^{2+}$  os extractos das espécies acima referidas revelaram valores mais elevados que os obtidas por Custódio *et al.* (2012). As diferenças observadas entre os dois estudos poderão ser devido ao facto de o processo de extracção utilizado ter sido diferente.

## 5. CONCLUSÃO

A espécie *I. galbana* T-ISO apresentou dois extractos com elevada actividade antioxidante (éter e acetona) pelo método de DPPH. Esta espécie também apresentou juntamente com a espécie *Tetraselmis sp.* elevada actividade antioxidante (ABTS) nos extractos de acetona e de água, revelando assim serem fontes promissoras de compostos antioxidantes.

Os resultados do presente estudo indicam que os extractos de éter e acetona (*Isochrysis galbana* T-ISO) e de hexano (*Tetraselmis sp.* e *Scenedesmus sp.*) poderão ser uma promissora fonte para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais (*I. galbana* T-ISO; extracto de acetona: elevada actividade antioxidante e antitumoral; IS=3,15). No entanto, até o composto bioactivo chegar à indústria farmacêutica necessitará de transpor várias etapas, nomeadamente a caracterização química dos extractos com bioactividade, isolamento do composto bioactivo, a avaliação da actividade antitumoral *in vivo* e a elucidação do seu mecanismo de acção.

Em relação a actividade neuroprotectora, o extracto de hexano revelou elevada actividade quelante tanto para o  $Fe^{2+}$  (*I. galbana* T-ISO, *N. oculata* e *Scenedesmus sp.*) como para o  $Cu^{2+}$  (*I. galbana* T-ISO, *Tetraselmis sp.* e *Scenedesmus sp.*). O extracto de hexano apresentou maior capacidade de quelar o  $Cu^{2+}$  do que o  $Fe^{2+}$ , revelando assim ser fontes de potenciais biocompostos para tratamento de doenças causadas por acumulo destes iões metálicos. Concluiu-se também que a maioria dos extractos das espécies analisadas neste estudo pode ser constituídos por compostos que poderão ser considerados fontes promissoras de compostos bioactivos para a inibição da AChE. Deste modo, estes extractos poderão ser alvo de pesquisa de compostos bioactivos para terapia clínica de várias doenças, principalmente os da espécie *I. galbana* T-ISO que apresentaram bioactividade em todos os tipos de ensaios testados.

Os extractos das microalgas analisados podem ser considerados como fontes de potenciais compostos bioactivos que poderão ser usados para pesquisa de novos compostos naturais. Estes compostos poderão ser usados nas indústrias alimentar de modo a substituir os vários compostos sintéticos em uso na conservação de alimentos, e na indústria

farmacêutica para desenvolvimento de medicamentos para prevenção e/ou tratamentos de doenças.

De uma forma geral, os extractos de água apresentaram maior rendimento de extracção, mas em contrapartida estes foram os que apresentaram menor actividade biológica nos diversos ensaios realizados, o que indica que apesar de as espécies em questão apresentarem uma elevada composição de compostos extractáveis pela água, esses não são os mais bioactivos. E este facto foi verificado neste estudo em que os extractos com menor rendimento revelaram diversos tipos de actividade biológica.

## 6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Será necessário proceder ao fraccionamento dos extractos usando sistemas de cromatografia de forma a poder avaliar qual o composto ou compostos responsáveis pelas actividades biológicas das microalgas estudadas através de, por exemplo, cromatografia gasosa com espectrometria de massa.

É imprescindível a análise dos extractos orgânicos de *I. galbana* T-ISO (éter e acetona), *Tetraselmis sp.* (hexano) e *Scenedesmus sp.* (hexano) para avaliar de que maneira estes extractos diminuem a viabilidade celular, nomeadamente o seu impacto no ciclo celular, a sua capacidade de activar a morte celular programada (apoptose) ou os danos que causam ao nível das mitocôndrias e DNA.

Da mesma forma, é fundamental realizar estudos de cinética da enzima AChE de modo a compreender os possíveis factores bioquímicos e físicos que influenciaram os resultados obtidos em alguns extractos, e na variação da actividade de inibição da enzima nas diferentes concentrações testadas.

Em estudos subsequentes será necessário testar os extractos que revelaram actividade antitumoral de modo a verificar se estes extractos exibem actividade citotóxica às outras linhas celulares tumorais, bem como avaliar a sua actividade *in vivo*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe M, Inoue D, Matsunaga K, Ohizumi Y, Ueda H, Asano T, Murakami M and Sato Y. 2002. Goniodomin A, an antifungal polyether macrolide, exhibits antiangiogenic activities via inhibition of actin reorganization in endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*. **190**: 109-116.
- Al-Dabbas M M, Suganuma T, Kitahara K, Hou D X and Fujii M. 2006. Citotoxicity, antioxidant and antibacterial activities of *Varthemia iphionoides* Boiss. Extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. **108**. 287-293.
- Antia N J and Cheng J Y. 1982. The keto-carotenoids of two marine coccoid members of the Eustigmatophyceae. *British journal of physiological*. **17**: 39-50.
- Aruoma OI and Halliwell B. 1987. Superoxide-dependent and ascorbate-dependent formation of hydroxyl radicals from hydrogen peroxide in the presence of iron: Are lactoferrin and transferrin promoters of hydroxyl radical generation? *Biochemical Journal*. **241**: 273-278.
- Ata A, Win H Y, Holt D, Holloway P, Segstro EP and Jayatilake G S. 2004. New antibacterial diterpenes from *Pseudopterogorgia elisabethae*. *Helvetica Chimica Acta*. **87**: 1090-1098.
- Ayyad S E N, Abdel-Halim O B, Shier, W T and Hoye T R. 2003. Cytotoxic hydroazulene diterpenes from the brown alga *Cystoseira myrica*. *Zeitschrift für Naturforschung C-A. Journal of Biosciences*. **58**: 33-38.
- Baker R and Gunther C. 2004. The role of carotenoids in consumer choice and the likely benefits from their inclusion into products for human consumption. *Trends in Food Science and Technology*. **15**: 484-488.
- Ballard C G, Greig N H, Guillozet-Bongaarts A L, Enz A and Darvesh S. 2005. Cholinesterases: roles in the brain during health and disease. *Current Alzheimer Research*. **2**: 307-318.
- Banerjee A, Sharma, Chisti, Y and Banerjee U C. 2002. *Botryococcus braunii*: A Renewable Source of Hydrocarbons and Other Chemicals. *Critical Reviews in Biotechnology*. **22**: 245-279.
- Barros L, Ferreira MJ, Queirós B, Ferreira I and Baptista P. 2007. Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. *Food Chemistry*: **103**: 413-419.

- Barros L, Falcão S, Baptista P, Freire C, Vilas-Boas M and Ferreira I C F R. 2008. Antioxidant activity of *Agaricus sp.* Mushroom by chemical, biochemical and electrochemical assays. *Food Chemistry*: **111**: 61-66.
- Becker E W. 1994. *Microalgae: Biotechnology an Microbiology*. Cambridge: Cambridge University press. pp. 230.
- Bie P, Muller P, Wijmenga C, and Klom L W J . 2007. Molecular pathogenesis of Wilson and Menkes disease: correlation of mutations with molecular defects and disease phenotypes. *Journal of Medical Genetics*. **4**: 673-688.
- Bianchi M L P Antunes L M G. 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. *Revista de Nutrição*. **12**: 123-130.
- Blunt J W, Copp B R, Munro MHG, Northcote P T and Prinsep M R. 2004. Marine Natural products. *Natural Product Reports*. **21**: 1-49.
- Blunt JW, Coop BR, Munro M H G, Northcote PT and Prinsep M R. 2005. Marine Natural Products. *Natural Product Reports*. **22**: 15-61.
- Brand-Williams W, Cuvelier M E and Berset C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*. **28**: 25-30.
- Brentani RR, Chammas R, Coelho FRG. 1998. Mecanismos de invasão e metástases. In: Brentani M N, Coelho F R G, Iyeyasu H and Kowalski L P. ed. - Bases da Oncologia. 1.<sup>a</sup> ed. São Paulo, Livraria e Editora Marina. p.91-98.
- Brown M R, Jeffrey S W, Volkman J K, Dunstan GA. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Nutritional properties of microalgae for mariculture. Aquaculture*.**15**: 315-331.
- Calviello G, Palozza P, Piccioni E, Maggiano N, Frattucci A, Franceschelli P and Bartoli GM. 1998. Dietary supplementation with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid inhibits growth of Morris hepatocarcinoma 3924A in rats: effects on proliferation and apoptosis. *International Journal of Cancer*.**75**: 699 -705.
- Cardozo KHM, Guarantini T, Barros MP, Falcão VR, Tonon AP, P. Lopes NP, Campos S, Torres MA, Souza AO, Colepicolo P and Pinto E. 2007. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **146**: 60-78.
- Carlsson A S, Beilen J B, Möller Rand Clayton D. 2007. Micro and macroalgae utility for industrial applications. *Outputs from the EPOBIO project. CPLPress*.
- Carte B K. 1996. Biomedical potential of marine natural products. *Bioscience*. **46**: 271-286.

- Cha K H, Koo S Y and Lee Dong-Un . 2008. Antiproliferative Effects of Carotenoids Extracted from *Chlorella ellipsoidea* and *Chlorella vulgaris* on Human Colon Cancer Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **56**: 10521-10526.
- Chattopadhyay N, Ghosh T, Sinha S, Chattopadhyay K, Karmakar P and Ray B. 2009. Polysaccharides from *Turbinaria conoides*: Structural feats and antioxidant capacity. *Food Chemistry*. doi: 10.1016.2009.
- Chill L, Rudi A, Aknin M, Loya S, Hizi A and Kashman Y. 2004. New sesterterpenes from Madagascan Lendenfeldia sponges. *Tetrahedron*. **60**: 10619-10626.
- Chisti Y. 2004. Environmental impact of toxic pollutants. *Biotechnology Advances*. **6**: 431-432.
- Chisti Y. 2007. Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*. **25**: 294- 306.
- Chopra K and Kuhad A. 2007. Curcumin attenuates diabetic encephalopathy in rats. Behavioral and biochemical evidences, *European Journal of Pharmacology*. **576**: 34-42.
- Chu F L, Pirastru L, Popovic R, and Sleno L. 2011. Carotenogenesis Up-regulation in *Scenedesmus sp.* Using a Targeted Metabolomics Approach by Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* . **59**: 3004-3013.
- Conner W E and Neuringer M. 1987. Importance of Dietary Omega-3 Fatty Acids in Retinal Function and Brain Chemistry, in *Nutritional Modulation of Neural Function*. *Academic Press*. New York. pp.191-200.
- Connor J R, Snyder B S, Beard J L, Fine R E and Mufson E J. 1992. Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research*. **31**: 327-335.
- Custódio L, Justo T, Silvestre L, Barradas A, Vizetto C, Pereira H, Barreira L, Rauter AP, Alberício F and Varela J. 2012. Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chemistry*. doi:10.1016/j.foodchem.2011.08.047.
- Danks D. M. 1989. Disorders of copper transport. In *The Metabolic Basis of Inherited Disease* (Scriver, C. R, Beaudet, A. L, Sly, W. S. and Valle, D. eds.). McGraw-Hill. New York. pp. 1411-1432.
- Davies P and Maloney A J F. 1976. Selective loss of central cholinergic neurons in Alzheimer's disease. *The Lancet*. **2**: 1403.

- Del Campo J A, Garcia-Gonzalez M and Guerrero M G. 2007. Outdoor cultivation of microalgae for carotenoid production: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **74**: 1163-1174.
- Derner R B, Ohse S, Villela M, Carvalho S M and Fett R. 2006. Microalgas, produtos e aplicações. *Ciência Rural*. **6**: 1959-1967.
- Descarries L, Gisiger V, and Steriade M. 1997. Diffusion transmission by acetylcholine in CNS. *Progress in Neurobiology*. **53**: 603-625.
- Dexter D T, Wells F R, Agid F, Agid Y, Lees A J, Jenner P and Marsden CD. 1987. Increased nigral iron content in post mortem parkinsonian brain. *The Lancet*. **2**: 1219-1220.
- Dixon K and Koprás E. 2004. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. *Seminars in Cancer Biology*. **14**: 441-448.
- Donia M and Hamann M T. 2003. Marine natural products and their potential applications as anti-infective agents. *The Lancet*. **3**: 338-348.
- Edinger A L and Thompson C B. 2004. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*. **16**: 663-339.
- Elmastas M, Isildak O, Turkekul I and Temur N. 2007. Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*. **20**: 337-345.
- Endo T, Tsuda M, Okada T, Mitsuhashi S, Shima H, Kikuchi K, Mikami Y, Fromont J and Kobayashi J. 2004. Nagelamides A-H, new dimeric bromopyrrole alkaloids from marine sponge *Agelas* species. *Journal of Natural Products*. **67**: 1262-1267.
- Eynard A R and Lopez C B. 2003. Conjugated linoleic acid (CLA) versus saturated fats/cholesterol: their proportion in fatty and lean meats may affect the risk of developing colon cancer. *Lipids in Health and Disease*. **2**.
- Faulkner D J. 2002. Marine natural products. *Natural Product Reports*. **19**:1-48.
- Fazeli M R, Tofighi H, Samadi N and Jamalifar H. 2006. Effects of salinity on beta-carotene production by *Dunaliella tertiolecta* DCCBC26 isolated from the *Urmia salt* lake, north of Iran. *Bioresource Technology*. **97**: 2453-2456.
- Feder J N. 1996. A novel MHO class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nature Genetics*. **13**: 399-408.
- Ferreira A L A e Matsubara L S. 1997. Radicais livres: Conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica do Brasil*. **43**: 61-68.

- Ferruzi M G and Blakeslee J. 2007. Digestion, absorption, and cancer preventive activity of dietary chlorophyll derivatives. *Nutrition Research*. **27**: 1-12.
- Fidalgo P, Cid A T E, Sukenik A and Herrero C. 1998. Effects of nitrogen source and growth phase on proximate biochemical composition, lipid classes and fatty acid profile of the marine microalgae *Isochrysis galbana*. *Aquaculture*. **166**: 105-116.
- Field C J and Schley P D. 2004. Evidence for potential mechanisms for the effect of conjugated linoleic acid on tumor metabolism and immune function: lessons from n-3 fatty acids<sup>1-4</sup>. *The American Journal of Clinical Nutrition*. **79**: 1190S-8S.
- Fisher T, Berner T, Iluz D and Dubinsky Z. 1998. The kinetics of photoacclimation response of *Nannochloropsis* sp (*Eustigmatophyceae*): A study of changes in ultrastructure and PSU density. *Journal of Phycology*. **34**: 818-824.
- Fuesetani N. 2000. In *Drugs from the Sea*. Fuesetani M. (Ed). Basel: Karger. **1**: 1-5.
- García-Ayllón M-S, Riba-Llena I, Serra-Basante C, Alom J, Boopathy R, Javier Sáez-Valero. 2010. Altered Levels of Acetylcholinesterase in Alzheimer Plasma. *PLoS ONE*. **5**: e8701. doi:10.1371/journal.pone.000870.
- Garg H S, Sharma T, Bhakuni D S, Pramanik B N and Bose A K. 1992. An antiviral sphingosine derivative from green alga *Ulva fasciata*. *Tetrahedron lett*. **33**: 1641-1644.
- Gouveia L, Veloso V, Reis A, Fernandes H, Novais J and Empis J. 1996. Evolution of pigment composition in *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*. **57**: 157-159.
- Gouveia L, Batista A P, Sousa I, Raymundo and Bandarra N M. 2008. Marine in novel food products. In: Papadopoulos K N, editor. Food chemistry research developments: Chapter 2. *New Science Publisher Inc*. New York. USA.
- Haefner B. 2003. Drugs from the deep: marine natural products as drug candidates. *Drug Discovery Today*. **8**: 536-44.
- Halliwell B, Aeschbach R, Löliger J and Aruoma O I. 1995. The characterization of antioxidants. *Food Chemistry and Toxicology*. **33**: 601-617.
- Hande K R. 1998. Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II 538 inhibitor. *Eur J Cancer*. **34**: 1514-1521.
- Hoek C van den, Mann D G and Jahns, H M. 1995. Algae: an introduction to Phycology. *Cambridge University Press*. Cambridge. 623p.
- Hou W, Wu W, Yang C, Chen H, Liu S, and Lin Y. 2004. Antioxidant activities of leaf extracts of *Liriope spicata* L. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*. **45**: 285-290.

- Hussain S R, Cillar J and Cillard P. 1987. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*. **26**: 2489-2491.
- Ireland C, Copp B, Foster M, McDonald L, Radisky D and Swersey J. 1993. In *Marine Biology*. Attaway D, Zeborsky O. Plenum Press: New York. .I:1-43.
- Jacobs R S, Culver P, Langdon R, O'Brien T and White S. 1985. Some pharmacological observations on marine natural products. *Tetrahedron*. **4**: 981-984.
- Jeong S J, Higuchi R, Miyamoto T, Ono M, Kuwano M and Mawatari S F. 2002. Bryoanthrathiophene, a new antiangiogenic constituent from the bryozoan *Watersipora subtorquata* (d'Orbigny, 1852). *Journal of Natural Products*. **65**: 1344-1345.
- Kato I, Dnistrian A M, Schwartz M, Toniolo P, Koenig K, Shore R E, Zeleniuch E-J A, Akhmedkhanov A and Riboli E. 1999. Iron intake, body iron stores and colorectal cancer risk in women: a nested case-control study. *International Journal of Cancer*. **80**: 693-698.
- Kay R A. 1991. Microalgae as food and supplement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **30**: 555- 573.
- Kawashima K and Fujii T. 2000. Extraneural cholinergic system in lymphocytes. *Pharmacology and therapeutics*. **86**: 29-48.
- Kiffe M, Nokihara K and Matsunaga T. 1995. Purification of docosa-hexaenoic acid (DHA) produced by marine microalga *Isochrysis galbana*. *Journal of Marine Biotechnology*. **2**: 139-142.
- Kil H Y, Seong E S, Ghimire B K, Chung IM, Kwon S S, Goh E J, Heo K, Kim M, Lim J D, Lee D and Yu C Y. 2009. Antioxidant and antimicrobial activities of crude sorghum extract. *Food Chemistry*. **115**: 1234-1239.
- Koehn F E, Longley R E and Reed J K. 1992. Microcolin A and B, new immunosuppressive peptides from the blue green alga *Lyngbya majuscula*. *Journal of Natural Products*. **55**: 613-619.
- Kossuga M H, MacMillan J B, Rogers E W, Molinski T F, Nascimento G G, Rocha R M and Berlinck R G. 2004. (2S,3R)-2-aminododecan-3-ol, a new antifungal agent from the ascidian *Clavelina oblonga*. *Journal of Natural Products*. **67**: 1879-188.
- Kützing F T. 1849. *Species algarum*. i-vi. 922pp.
- Kwon YH, Mansberger SL and Coffi GA. 2000. Retinal Ganglion Cell Death in Glaucoma: Mechanisms and Neuroprotective Strategies. *Medline*. **13**.

- Levin L A. 1999. Direct and indirect approaches to neuroprotective therapy of glaucomatous optic neuropathy. *Survey of Ophthalmology*. **43**: 98-101.
- Li H B, Jiang Y and Chen F. 2002. Isolation and purification of lutein from the microalga *Chlorella Vulgaris* by extraction after saponification. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **50**: 1070-1072.
- Libby R T, Gould D B, Anderson MG and João SW. 2005. Complex genetics of glaucoma susceptibility. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. **6**: 15-44.
- Lilies G. 1996. Gambling on marine biotechnology. *Bioscience*. **46**: 250-253.
- Liu Y, Zhao C, Li H, Yu M, Gao J, Wang L, Yongong Zhai Y . 2010. Cytotoxicity and apoptosis induced by a new podophyllotoxin glucoside in human hepatoma (HepG2) cells. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. **88**: 472-479.
- Lopez Alonso D, Molina G E, Sanchez P JA, Garcia S J L, Garcia C F . 1992. Isolation of clones of *Isochrysis galbana* rich in eicosapentaenoic acid. *Aquaculture*. **102**: 363-371.
- Lorenz R T and Cysewski G R. 2000. Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*. **18**: 160-167.
- Lysek N, Rachor E and Lindel T. 2002. Isolation and Structure Elucidation of Deformylflustrabromine from the North Sea Bryozoan *Flustra foliacea*. *Z. Naturforsch., C: Bioscience*. **57**: 1056-1061.
- Margalith P Z. 1999. Production of ketocarotenoids by microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **51**: 431-438.
- Marlowe I T, Brassell S C, Eglinton G and Green J C. 1990. Long-chain alkenones and alkyl alkenoates and the fossil coccolith record of marine sediments. *Chemical Geology*. **88**: 349-375.
- Marrero J, Rodríguez A D, Baran P, Raptis R G, Sanchez J A, Ortega-Barria E, and Capson T L. 2004. Bielschowskysin, a gorgonian-derived biologically active diterpene with an unprecedented carbon skeleton. *Organic Letters*. **6**: 1661-1664.
- Maskey R P, Helmke E, Kayser O, Fiebig H H, Maier A, Busche A and Laatsch H. 2004. Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with high antimalaria activity from a marine streptomycete and their absolute stereochemistry. *The Journal of Antibiotics*. **57**: 771-779.
- Massoulie J. 2002. The origin of the molecular diversity and functional anchoring of cholinesterases. *Neurosignals*. **11**: 130-143.

- Mata T M, Martins A A and Caetano N S. 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. **14**: 217-232.
- Mayer A M S and Hamann M T. 2005. Marine pharmacology in 2001-2002: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antidiabetic, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiplatelet, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune, and nervous systems and other miscellaneous mechanisms of action. *Comparative Biochemistry and Physiology*. **140**: 265-286.
- Megías C, Pastor-Cavada E, Torres-Fuentes C, Girón-Calle J, Alaiz M, Juan R, Pastor J and Javier V. 2009. Chelating, antioxidant and antiproliferative activity of *Vicia sativa* polyphenol extracts. *European Food Research and Technology*. **230**: 353-359.
- McHugh D J. 2003. A guide to the seaweed industry. Rome, FAO. *FAO Fisheries Technical Paper*. 441p.
- Mendes R L, Fernandes H L, Coelho J P, Reis E C, Cabral J M S, Novais J M and Palabra A F. 1995. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of carotenoids and other lipids from *Chlorella vulgaris*. *Food Chemistry*. **53**: 99-103.
- Mendes R L, Nobre B P, Cardoso M T, Pereira A P and Palabra A F. 2003. Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae. *Inorganica Chimica Acta*. **356**: 328-334.
- Mesulam M M, Guillozet A, Shaw P and Levey A. 2002. Acetylcholinesterase Knockouts establish central cholinergic pathways and can use butyrylcholinesterase to hydrolyze acetylcholine. *Neuroscience*. **110**: 627-639.
- Meyen F J F. 1829. Beobachtungen iibereinige niedere Algenformen. *Nova Acta Physico-Medica Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Naturae*. **14**: 768-778.
- Miao Z Q, Liu X Z, Li S D and He M X. 2003. *Dactylella pseudoclavata* sp., a new nematode-trapping fungus. *Canadian Journal of Botany*. **81**: 452-456.
- Mohd S, Natrah F, Md Yusoff, Fatimah M D, Mohamed S, Abas F and Nor S M. 2007. Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *Journal of Applied Physiology*. **19**: 711-718.
- Morris S A, De Silva E D and Anderson R J. 1990. Chromodorane diterpenes from the tropical dorid nudibranch *Chromocloris cavae*. *Canadian Journal of Chemistry*. **69**: 768-771.

- Mosman T. 1983. Rapid colometric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. **65**: 55-63.
- Nanji A A, Sadrzadeh SM, Dannenberg AJ. 1994. Livermicromal fatty acid composition in ethanol-fed injury. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*. **18**: 1024-1028.
- Natrah F M I, Yusoff F M, Shariff M, Abas F and Maria N. S. 2007. Screening of Malaysian indigenous microalgae for antioxidant properties and nutritional value. *Journal of Applied Phycology*. **19**: 711-718.
- Newman D J and Cragg G M.. 2004. Marine Natural Products and Related Compounds in Clinical and Advanced Preclinical Trials. *Journal of Natural Products*. **67**: 1216-1238.
- Noguchi N and Niki E. 2000. Forum: Therapeutic Applications of Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Human Disease. Free Radical. *Journal of Biology and Medicine*. **28**: 1538-1546.
- Olaizola M. 2003. Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*. **20**: 459-466.
- Oliveira P A, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz L F P and Lopes C. 2007. Chemical carcinogenesis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. **79**: 593-616.
- Orhan I, Kartal M, Naz Q, Ejaz A, Yilmaz G, Kan Y, Konuklugil B, Sener B and Choudhary M I. 2007. Antioxidant and anticholinesterase evaluation of selected Turkish *Salvia* species. *Food Chemistry*. **103**: 1247-1254.
- Ovchinnikova T V, Aleshina G M, Balandin S V, Krasnosdembskaya A D, Markelov M L, Frolova E I, Leonova Y F, Tagaev A A, Krasnodembsky E G and Kokryakov V N. 2004. Purification and primary structure of two isoforms of arenicin, a novel antimicrobial peptide from marine polychaeta *Arenicola marina*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. **577**: 209-214.
- Parke M. 1941. Studies on marine flagellates. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*. **28**: 255-289.
- Pereira H S, Leao-Ferreira L R, Moussatche N, Teixeira V L, Cavalcanti D N, Costa L J, Diaz R and Frugulhetti I C. 2004. Antiviral activity of diterpenes isolated from the Brazilian marine alga *Dictyota menstrualis* against human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Antiviral Research*. **64**: 69-76.
- Perry E K, Perry R H, Blessed G and Tomlinson BE. 1977. Necropsy evidence of central cholinergic deficits in senile dementia. *The Lancet*. **1**: 189.

- Pettit G R, Cichacz Z A, Gao F, Herald C L and Boyd M R. 1993. Isolation and structure of the remarkable human cancer cell growth inhibitors spongistatins 2 and 3 from an Eastern India Ocean *Spongia* sp. *Journal of the Chemical Society*. **1**: 1166-1168.
- Pettit G R, Singh S B, Hogan F, Lloyd-Williams P, Herald C L, Burbett D D, Clewlow P J. 1989. The absolute configuration and synthesis of natural (-)-dolostatin10. *Journal of the American Chemical Society*. **70**: 5463-5465.
- Pettit G R. 1991. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Herz W, Kinby G W, Steglich W and Tamm C. Ed. *Springer Verlag*: Berlin. **57**: 153-195.
- Pinero D J, Hu J and Conno R J R. 2000. Alterations in the interaction between iron regulatory proteins and their iron responsive element in normal and Alzheimer's diseased brains. *Cellular and Molecular Biology*. **46**: 761-776.
- Plaza M, Cifuentes A, Ibanez E. 2008. In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in Food Science and Technology*. **19**: 31- 39.
- Plaza M, Herrero M, A Cifuentes and E Ibáñez. 2009. Innovative natural functional ingredients from microalgae. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. **57**: 7159-7170.
- Princep M R, Blunt J W and Munro M H G. 1991. New cytotoxic B-carboline alkaloids from the marine bryzoans *Cribricellina cribraria*. *Journal of Natural Products*. **54**: 1068-1076.
- Przeslawski R, Bourdeau P E, Doall M H, Pan J, Perino L and Padilla DK. 2008. The effect of a harmful alga on bivalve larval lipid stores. *Harmful Algae*. **7**: 802-807.
- Pulok K M, Venkatesan K, Mainak M and Houghton P J. 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine*. **14**: 289-300.
- Pulz O and Gross W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **65**: 635-648.
- Qian Z M and Wang Q. 1998. Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders. *Brain Research Reviews*. **27**: 257-267.
- Rajaganapathi J, Kathiresan K and Singh T P. 2002. Purification of Anti-HIV Protein from purple fluid of the Sea Hare *Bursatella leachii* of Blainville. *Journal of Marine Biotechnology*. **4**: 447-453.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. **26**: 1231-1237.

- Riederer P, Sofic E, Rausch WD, Schmidt B, Reynolds G P, Jellinger K and Youdim M B. 1989. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *Journal of Neuroscience Research*. **52**: 515-520.
- Roos PM, Vesterberg O and Nordberg M. 2006. Metals in motor neuron diseases. *Experimental Biology and Medicine*. **231**: 1481-1487.
- Rosa A, Deidda D, Serra A, Deiana M, Dessì A and Pompei R. 2005. Omega-3 fatty acid composition and biological activity of three microalgae species. *Journal of Food Agriculture and Environment*. **3**: 120-124.
- Sahaa M R, Hasana S M R, Aktera R, Hossaina M M, Alamb M S, Alam M A, and Mazumder M E H. 2008. *In vitro* free radical scavenging activity of methanol extract of the leaves of *Mimusops elengi* linn. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*. **6**: 197-200.
- Salmon S E and Sartorelli A C. 2003. Quimioterapia do câncer. In Katzung B G (Ed.) *Farmacologia básica e clínica*. 8.<sup>a</sup> Edição. Rio de Janeiro. Guanabara. **55**: 803-832.
- Samori C, Torr C, Samorì G, Fabbri D, Galletti P, Guerrini F, Pistocchi R, Tagliavini E. 2010. Extraction of hydrocarbons from microalga *Botryococcus braunii* with switchable solvents. *Bioresource Technology*. **101**: 3274-3279.
- Sanchez-Chavez G and Salceda R. 2000. Effect of streptozotocin-induced diabetes on activities of cholinesterase in the rat retina. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*. **49**: 283-287.
- Seiffert M E B, Cerqueira V R and Madureira L A S. 2001. Effect of dietary (n-3) highly unsaturated fatty acids on growth and survival of fat snook (*Centropomus parallelus*, Pisces: Centropomidae) larvae during first feeding. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **34**: 645-651.
- Shi X, Wu Z and Chen F. 2006. Kinetic modeling of lutein production by heterotrophic *Chlorella* at various pH and temperatures. *Molecular Nutrition and Food Research*. **50**: 763-768.
- Shu C-H, L and Lung M-Y. 2008. Effect of culture pH on the antioxidant properties of *Antrodia camphorate* in submerged culture. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers*. **39**: 1-8.
- Soreq H and Seidman S. 2001. Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*. **2**: 294-302.
- Staats P S, Yearwood T, Charapata S G, Presley R W, Wallace M S, Byas-Smith M, Fisher R, Bryce D A, Mangieri E A, Luther R R, Mayo M, McGuire D and Ellis D. 2004.

- Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS—a randomized controlled trial. *Journal of the American Medical Association*. **291**: 63-70.
- Stein F von. 1878. *Organismus Infusionsthier. III. Flagellaten*. Leipzig: Engelmann. **I**: 1-154.
- Steller H. 1995. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. **267**: 1445-1449.
- Suganthi N, Nisha S.A, Pandian, K S and Devi K P. 2010. Antioxidant and metal chelating potential of the solvent fractions of *Gelidiella acerosa*, the red algae inhabiting South Indian coastal area. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. doi:10.1016/j.biopha.2010.09.022.
- Thompson K, Menzies S, Muckenthaler M , Torti FM , Madeira T , Torti SV , Hentze MW, Beard J and J Connor. 2003. Mouse brains deficient in H-ferritin have normal iron concentration but a profile of iron deficiency and increased evidence of oxidative stress. *Journal of Neuroscience Research*. **71**: 46-63.
- Tomas C R. 1996. Identifying marine diatoms and dinoflagellates. California. U.S.A *Academis Press*. INC. 598p.
- Torres Y R, Bugni T S, Berlinck R G S, Ireland C M, Magalhães A, Ferreira A G and da Rocha R M. 2002. Sebastianines A and B, novel biologically active pyridoacridine alkaloids from the Brazilian ascidian *Cystodytes dellechiaiei*. *Journal of Organic Chemistry*. **67**: 5429-5432.
- Tuzcu M and Baydas. 2006. Effect of melatonin and vitamin E on diabetes-induced learning and memory impairment in rats. *European Journal Pharmacology*. **537**: 106-110.
- van Poppel G. 1993. Carotenoids and cancer: An update with emphasis on human intervention studies. *European Journal of Cancer*. **29A**: 1335-1344.
- Vinutha B, Prashanth D, Salma K, Sreeja S L, Pratiti D, Padmaja R, Radhika S, Amit A, Venkateshwarlu K and Deepak M. 2007. Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*. **109**: 359-363.
- Vulpe C D and Packman S. 1995 Cellular copper transport. *Annual Review of Nutrition*. **15**: 293-322.
- Xiao R, Power R F, Mallonnee D, Crowdus C, Brennan K M, Ao T, Pierce J L and Dawson K A. 2010. A comparative transcriptomic study of vitamin E and an algae-based antioxidant as antioxidative agents: Investigation of replacing vitamin E with the algae based antioxidant in broiler diets. *Poultry Science*. **90**: 136-146.

- Yamaguchi K. 1997. Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: a review. *Journal of Applied Phycology*. **8**: 487-502.
- Yamada T, Iwamoto C, Yamagaki N, Yamanouchi T, Minoura K, Yamori T, Uehara Y, Andoh T, Umemura K and Numata A. 2002. Leptosins M-N1, cytotoxic metabolites from *Leptosphaeria* species separated from marine algae. Structure determination and biological activities. *Tetrahedron*. **58**: 479-487.
- Wang G H, Ahmed A F, Kuo Y H and Sheu J H. 2002. Two new subergane-based sesquiterpenes from Taiwanese gorgonian coral *Subergorgia suberosa*. *Journal of Natural Products*. **65**: 1033-1036.
- Wijffels R H. 2007. Potential of sponges and microalgae for marine biotechnology. *Trends in biotechnology*. **26**: 26-31.
- Zancan P and Mourao P A. 2004. Venous and arterial thrombosis in rat models: dissociation of the antithrombotic effects of glycosaminoglycans. *Blood Coagulation. Fibrinolysis*. **15**: 45-54.
- Zhang H, Shigemori H, Ichibashi M, Kosaka T, Pettit G R, Kamano Y and Kobayashi J. 1994. Convolutamides A-F, novel  $\gamma$ -lactam alkaloids from the marine bryozoan *Amathia convoluta*. *Tetrahedron*. **50**: 10201-10206.