



ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

Extratos de algas marinhas comestíveis aplicados para a redução do risco de doenças cardiovasculares.

Mariana Pinto Coelho

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em
Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Professora Doutora Rita Pacheco

Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro

Júri:

Presidente: Professor Doutor José Augusto Paixão Coelho

Vogais: Professora Doutora Rita Isabel Dias Pacheco

Professora Doutora Catarina Pinto Reis

Professora Doutora Ana Maria G. H. Barreiros Joanaz de
Melo

Julho 2022

Agradecimentos

Em primeiro lugar, um agradecimento especial à minha orientadora, a Professora Doutora Rita Pacheco, pela orientação, disponibilidade, transmissão de conhecimentos, o apoio no decorrer do trabalho experimental e sugestões ao longo de todo o trabalho.

À Professora Doutora Maria Luísa Serralheiro por me ter recebido no seu grupo de trabalho, pela transmissão de conhecimentos, nomeadamente, na parte da espectrometria de massa e pela revisão desta dissertação.

Do laboratório da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL) gostaria de agradecer à Laura Guedes e à Rebeca André por toda a ajuda no trabalho laboratorial e transmissão de conhecimentos. E à Rita Guedes por toda a ajuda com a análise dos resultados da espectrometria de massa.

Um agradecimento especial à minha irmã pela revisão desta dissertação e à minha amiga Diana, por ter partilhado os seus conhecimentos sobre a hipercolesterolemia.

Quero agradecer também à minha família por toda a paciência e apoio durante esta etapa.

Resumo

Apesar do progresso na mudança no estilo de vida e terapias farmacológicas para a prevenção de doenças cardiovasculares (DCV), estas permanecem a principal causa de morte em todo o mundo, sendo a hipercolesterolemia um dos fatores de risco. A ingestão de alguns produtos naturais, em combinação com fármacos anti-hiperlipidêmicos, tem sido frequentemente reportada como uma estratégia para a terapia da hipercolesterolemia. Assim sendo, tem existido um aumento no interesse em algas como produtos naturais comestíveis, devido aos reportados benefícios e propriedades que os seus compostos bioativos apresentam.

Este trabalho teve por base o estudo do potencial terapêutico dos compostos presentes em extratos aquosos de algas marinhas comestíveis, nomeadamente extratos de *Eisenia bicyclis*, *Porphyra* spp e *Fucus vesiculosus* vulgarmente designados Aramé, Nori e Fucus.

Iniciou-se o trabalho com a caracterização dos extratos das algas, relativamente à composição em fenóis totais, polissacáridos e proteínas e por HPLC-DAD. O extrato de Aramé foi o que apresentou maior quantidade em fenóis totais $0,063 \pm 0,005$ mg PGE/ mg massa seca, enquanto que o extrato de Nori apresentou maior quantidade de polissacáridos $0,583 \pm 0,004$ mg PE/ mg massa seca. Apenas o extrato de Fucus apresentou uma reduzida quantidade de proteínas de $0,0074 \pm 0,0004$ mg proteína/ mg massa seca. Foi ainda efetuado o fracionamento dos compostos presentes nos extratos, recorrendo a uma extração em fase sólida (SPE) no entanto, por HPLC-DAD verificou-se que nos extratos purificados ocorreu perda de alguns compostos e os extratos aquosos não purificados foram usados para a avaliação do efeito biológico.

Relativamente às atividades biológicas associadas aos extratos, o extrato de Aramé foi o que apresentou maior atividade antioxidante 65 ± 3 % e a menor quantidade de extrato com capacidade de reduzir a atividade antioxidante em 50 % (EC_{50}) de 0,174 mg/mL. Verificou-se ainda que, na atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE), o extrato de Nori foi o que permitiu obter uma percentagem de inibição mais elevada 42 ± 2 %, evidenciando uma potencial capacidade terapêutica relativamente a doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer. O extrato de Aramé apresentou maior capacidade de inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutarilo redutase (HMGR) 79 ± 7 % evidenciando o seu potencial para utilização na redução da hipercolesterolemia.

Todos os extratos revelaram ser seguros e não citotóxicos em linhas celulares humanas de células do fígado e intestino, Hep-G2 e Caco-2. E o estudo do metaboloma

das células Caco-2 e Hep-G2 expostas aos extratos das algas revelou que, em ambas as linhas celulares, os extratos provocaram alterações nos metabolitos associados a várias vias metabólicas, nomeadamente em metabolitos associados ao metabolismo energético da respiração celular, como o ácido succínico e nos nucleótidos e, também nos fosfolípidos que estão relacionados com efeitos sobre a membrana celular. Em particular, no caso das células Hep-G2 em contacto com o extrato de Nori verificou-se que aumentou a glutatona oxidada (GSSG) enquanto, nas células controlo aparece em maior quantidade a glutatona reduzida (GSH), o que pode estar relacionado com o efeito dos compostos do extrato da alga com um aumento do stress oxidativo nas células Hep-G2.

Foi investigado o efeito dos extratos sobre a linha celular Caco-2, após a sua diferenciação, simulando um modelo da barreira gastrointestinal. Verificou-se que todos os extratos apresentaram capacidade de reduzir a permeação do colesterol na barreira entre 20 a 28 %, à semelhança do fármaco ezetimiba prescrito para a terapêutica da hipercolesterolemia. Na presença de ezetimiba, os extratos de Aramé e Fucus aumentaram a redução da permeação do colesterol em 39 ± 4 % e 52 ± 4 %, respetivamente. Verificou-se ainda que alguns compostos dos extratos são capazes de permear a barreira gastrointestinal, o que evidencia o potencial destes alcançarem vários alvos no organismo após a ingestão dos extratos, nomeadamente o fígado.

Por fim, de modo a compreender o mecanismo dos extratos sobre a redução da permeação do colesterol, foi analisado o efeito destes sobre as proteínas de membrana associadas ao transporte do colesterol, a proteína de Niemann-pick like 1 (NPC1L1) e o transportador *ATP-Binding Cassette G5* (ABCG5) por *Western Blotting*, quer nas células Caco-2 quer nas células Hep-G2. Os extratos de Aramé e Fucus na linha celular Hep-G2 demonstraram ter a capacidade de aumentar a expressão do transportador NPC1L1, relativamente ao controlo. Os extratos de Aramé e Nori, em ambas as linhas celulares, demonstraram aumentar a expressão da proteína ABCG5, o que indica que, tendo em conta que este transportador está associado à excreção do colesterol nas membranas dos hepatócitos e dos enterócitos, o resultado dos extratos sobre a redução da permeação do colesterol poderá ser associado ao efeito sobre este transportador.

Em suma, os extratos aquosos das algas marinhas comestíveis Aramé, Nori e Fucus apresentaram diversas atividades biológicas que podem sugerir os efeitos benéficos que lhes são frequentemente atribuídos sobre a saúde em geral e, por isso, são recomendados serem incorporados na alimentação. Em particular, o extrato da alga Nori que demonstrou maior potencial no tratamento de doenças neurodegenerativas, e todos

os extratos que demonstraram ser eficazes no controlo da problemática de hipercolesterolemia e na prevenção de DCV, sendo o extrato da alga Aramé o que evidenciou maiores benefícios e ainda maior atividade antioxidante.

Palavras-chave: *Eisenia bicyclis*, *Porphyra* spp, *Fucus vesiculosus*, DCV, efeitos sobre a saúde, hipercolesterolemia, metabólica, HMGR, NPC1L1, ABCG5

Abstract

Despite progress in lifestyle changes and pharmacological therapies for the prevention of cardiovascular diseases (CVD), these remain the leading cause of death worldwide, with hypercholesterolemia being one of the risk factors. Ingestion of some natural products in combination with antihyperlipidemic drugs, has been frequently reported as a strategy for the therapy of hypercholesterolemia. For that reason, there has been an increase in interest in algae due to the benefits and properties that their bioactive compounds present.

This work was based on the study of the therapeutic potential of compounds present in aqueous extracts of edible seaweed like *Eisenia bicyclis*, *Porphyra* spp and *Fucus vesiculosus* habitually known as Aramé, Nori and Fucus.

In this work the extracts of seaweed were characterized by their composition in total phenols, polysaccharides, and proteins and by HPLC-DAD. The Aramé extracts showed the highest amount of total phenols, 0.063 ± 0.005 mg PGE/ mg dry mass, while the Nori extract presented the highest amount of polysaccharides, 0.583 ± 0.004 mg PE/ mg dry mass. Only the Fucus extract showed a reduced amount of protein of 0.0074 ± 0.0004 mg protein/mg dry mass. The fractionation of the compounds present in the extracts was also carried out, using solid-phase extraction (SPE). However, by HPLC-DAD was found that in the purified extracts, there was a loss of some compounds, and the non-purified aqueous extracts were used for the assessment of the biological effect.

Regarding the biological activities associated with the extracts, the Aramé extract showed the highest antioxidant activity 65 ± 3 % and the lowest amount of extract capable of reducing the antioxidant activity by 50 % (EC_{50}) of 0.174 mg/mL. It was also verified that, in terms of the inhibitory activity of the enzyme acetylcholinesterase (AChE), the Nori extract was the one that allowed to obtain a higher percentage of inhibition 42 ± 2 % showing a potential therapeutic capacity for neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's. The Aramé extract showed a better ability to inhibit the enzyme 3-hydroxy-3-methylglutaryl reductase (HMGR) 79 ± 7 %, evidencing its potential for use in the reduction of hypercholesterolemia.

All extracts were safe and non-cytotoxic in human liver and intestinal cell lines, Hep-G2 and Caco-2. And the study of the metabolome of Caco-2 and Hep-G2 cells exposed to the algae extracts revealed that, in both cell lines, the extracts caused changes in the metabolites associated with several metabolic pathways, namely in metabolites associated with the energy metabolism of cellular respiration, such as succinic acid and in nucleotides and in phospholipids that are related to effects on the cell membrane. In

the case of Hep-G2 cells in contact with Nori extract, was found that oxidized glutathione (GSSG) increased while in control cells, reduced glutathione (GSH) appears in greater quantity, which may be related to the effect of algae extract compounds with an increase in oxidative stress in HepG2 cells.

The effect of the extracts on the Caco-2 cell line, after its differentiation, was investigated, simulating a model of the gastrointestinal barrier. It was found that all extracts could reduce cholesterol permeation in the barrier between 28 to 20%, similar to the drug ezetimibe prescribed for the treatment of hypercholesterolemia. In the presence of ezetimibe, Aramé and Fucus extract increased the reduction of cholesterol permeation by $39 \pm 4 \%$ and $52 \pm 4 \%$, respectively. It was also found that some compounds of the extracts can permeate the gastrointestinal barrier, which shows the potential of these to reach several targets in the body after ingestion of the extracts, namely the liver.

Finally, to understand the mechanism of the extracts on the reduction of cholesterol permeation, the effect of these extracts on the membrane proteins associated with cholesterol transport, the Niemann-pick like 1 protein (NPC1L1) and the transporter ATP-Binding Cassette G5 (ABCG5) by Western Blotting, either in Caco-2 cells or in Hep-G2 cells. The Aramé and Fucus extracts in the Hep-G2 cell line showed the ability to increase the expression of the NPC1L1 transporter, relative to the control. The Aramé and Nori extracts and both cell lines were shown to increase the expression of the ABCG5 protein, which indicates that, given that this transporter is associated with the excretion of cholesterol in the membranes of hepatocytes and enterocytes, the result of the extracts on the reduction of cholesterol permeation may be associated with the effect on this transporter.

In summary, aqueous extracts of edible seaweeds Aramé, Nori and Fucus presented several biological activities that may suggest the beneficial effects that are often attributed to them. In particular, the Nori seaweed extract which showed the better potential in the treatment of neurodegenerative diseases. And the Aramé extract that proved to be effective in controlling the problem of hypercholesterolemia and in the prevention of CVD, showing the substantial benefits and even significant antioxidant activity.

Keywords: cholesterol, *Eisenia bicyclis*, *Porphyra* spp, *Fucus vesiculosus*, DCV, health effects, hypercholesterolemia metabolomics, HMGR, NPC1L1, ABCG5

Índice

Agradecimentos.....	i
Resumo	iii
Abstract	vii
Índice de figuras	xiii
Índice de tabelas.....	xxiii
Lista de siglas e abreviaturas.....	xxv
1. Introdução	1
1.1. Doenças cardiovasculares e o colesterol.....	1
1.2. Colesterol: absorção, homeostase e metabolismo.....	2
1.2.1. Biossíntese do colesterol.....	3
1.2.2. Proteínas transportadoras de colesterol	5
1.2.3. Absorção intestinal do colesterol	6
1.2.4. Transporte reverso	7
1.3. Terapêutica para o controlo da hipercolesterolemia.....	8
1.3.1. Mecanismo ação das Estatinas	8
1.3.2. Mecanismo de ação da Ezetimiba	9
1.3.3. Combinação de Ezetimiba e Estatinas.....	10
1.4. Algas comestíveis como fonte de compostos bioativos	11
1.4.1. <i>Porphyra</i> spp.	12
1.4.2. <i>Fucus vesiculosus</i>	14
1.4.3. <i>Eisenia bicyclis</i>	16
1.5. Atividades biológicas de compostos bioativos.....	18
1.5.1 Atividade antioxidante	18
1.5.2. Inibição da Acetilcolinesterase	19
1.5.3. Análise metabolómica - Efeitos celulares dos compostos bioativos.....	21
2. Objetivo.....	23
3. Materiais e métodos.....	25
3.1. Reagentes	25
3.2. Preparação dos extratos	26
3.3. Método de purificação de extratos de algas - Extração de fase sólida (SPE) ...	26
3.4. Ensaios de Quantificação de compostos nos extratos	27
3.4.1. Método de Folin-Ciocalteu – Quantificação de fenóis totais.....	27
3.4.3. Método do Fenol-Ácido Sulfúrico – Quantificação de polissacáridos	28
3.5. Análise por High-performance liquid chromatography with diode array (HPLC-DAD) dos extratos.....	28

3.6. Determinação de Atividades biológicas dos extratos.....	28
3.6.1. Atividade Antioxidante	28
3.6.2. Atividade de inibição da Acetilcolinesterase	29
3.6.3. Inibição da HMGR	30
3.7. Cultura das linhas celulares	30
3.7.1 Ensaio da citotoxicidade (MTT).....	31
3.7.2. Análise da permeação do colesterol em modelo da barreira gastrointestinal	31
3.7.3. Extração de metabolitos e proteínas	33
3.8. Análise do proteoma das suspensões celulares.....	33
3.8.1. Eletroforese SDS-PAGE das proteínas removidas das células Caco-2 e Hep-G2 após o contacto com os extratos de algas	33
3.8.2. <i>Western Blotting</i> das proteínas removidas das células Caco-2 e Hep-G2 após o contacto com os extratos de algas.....	34
3.9. Condições analíticas do LC-QTOF-MS	34
3.10. Análise Estatística de Resultados	35
4. Resultados e Discussão.....	37
4.1. Caracterização dos extratos e das frações purificadas	37
4.2. Toxicidade e atividades biológicas dos extratos das algas	42
4.2.1. Análise da citotoxicidade dos extratos e frações em linhas celulares Caco-2 e Hep-G2	42
4.2.2. Atividade Antioxidante dos extratos e frações	44
4.2.2. Inibição da acetilcolinesterase pelos extratos das algas.....	46
4.2.3. Inibição da HMGR pelos extratos das algas	47
4.3. Estudo do efeito dos extratos em linhas celulares Caco-2 e HepG2.....	49
4.3.1. Ação na barreira gastrointestinal – permeação do colesterol e de compostos bioativos	49
4.3.2. Análise por Espectrometria de Massa dos metabolitos extraídos	52
4.4. Estudo da ação dos extratos das algas sobre as proteínas celulares	67
4.4.1. Proteoma total das células Caco-2 e Hep-G2.....	67
4.4.2. Proteínas transportadores do colesterol NPC1L1 e ABCG5	71
5. Conclusões e Perspetivas Futuras	77
5.1. Conclusões.....	77
5.2. Perspetivas Futuras.....	80
Referências Bibliográficas	81
Anexos	105
1. Caracterização de extratos	105

1.1.	Quantificação de fenóis totais	105
1.2.	Quantificação de polissacáridos	106
1.3.	Reta de Calibração para quantificação de proteínas.....	107
1.5.	Cromatograma do extrato de Nori e frações purificadas	107
1.6.	Cromatograma do extrato de Fucus e frações purificadas	108
1.7.	Cromatograma floroglucinol.....	108
1.8.	Cromatograma floroglucinol 265 nm	109
1.9.	Quantificação de floroglucinol nos extratos de algas	109
2.	Determinação das Atividades Biológicas	111
2.1.	Citotoxicidade nas células Hep-G2 e Caco-2.....	111
2.1.1.	Hep-G2.....	111
2.1.2.	Caco-2.....	112
2.2.	Atividade Antioxidante – EC ₅₀	112
2.3.	Inibição da Acetilcolinesterase.....	112
2.3.1.	1º passo – velocidade do enzima	112
2.3.2.	2º passo – Atividade do enzima na presença de Aramé	113
2.3.3.	2º passo – Atividade do enzima na presença de Nori	115
2.3.4.	2º passo – Atividade do enzima na presença de Fucus	116
2.3.5.	2º passo – Atividade do enzima na presença de floroglucinol.....	118
2.4.	Inibição da HMGR	119
2.4.1.	1º passo – velocidade do enzima	119
2.4.2.	2º passo – Atividade do enzima na presença do inibidor padrão, pravastatina.....	120
2.4.3.	2º passo – Atividade do enzima na presença da Aramé	121
2.4.4.	2º passo – Atividade do enzima na presença da Nori	122
2.4.5.	2º passo – Atividade do enzima na presença do Fucus	123
3.	Ensaio em linhas celulares de Caco-2 e HepG2	125
3.1.	Efeito da ação dos extratos das algas na barreira gastrointestinal.....	125
3.2.	Efeito dos compostos bioativos dos extratos de algas na permeação da barreira gastrointestinal	133
3.3.	Resultados obtidos da ação dos extratos de Aramé, Nori e Fucus nos metabólitos de Células Caco-2 e Hep-G2	142
3.3.1.	Aramé	142
3.3.2.	Nori	145
3.3.3.	Fucus	149
3.4.	Reta de Calibração e Resultados obtidos no Método de Bradford	154

3.5.	SDS-PAGE.....	156
3.5.1.	Caco-2.....	156
3.5.2.	HepG2.....	160
3.6.	Western Blotting	165
3.6.1.	Caco-2.....	165
3.6.2.	HepG2.....	166

Índice de figuras

Figura 1- Molécula de colesterol, Código do Humam Metabolome Database (HMDB) - HMDB0000067. [6].....	3
Figura 2 - Esquema da biossíntese do colesterol, adaptado de [13].	4
Figura 3 – Absorção intestinal e transporte reverso do colesterol – Esquema das proteínas de transporte de colesterol nos hepatócitos e enterócitos, adaptado de [56].....	7
Figura 4 - Alga <i>Porphyra</i> spp., conhecida como Nori. [107]	12
Figura 5 - Estrutura dos compostos fenólicos identificados na Nori, Taurina e o florotanino: floroglucinol -trihidrobenceno.....	14
Figura 6 - <i>Fucus vesiculosus</i> , [107].....	15
Figura 7 – Estrutura de polissacáridos sulfatados identificados no <i>Fucus</i> , fucoidano e fucoxantina.....	16
Figura 8 - <i>Eisenia bicyclis</i> , conhecida como Aramé, [107].	16
Figura 9 - Estrutura dos compostos fenólicos, eckol e dieckol, identificados na Aramé.	17
Figura 10 – Representação da quantidade do neurotransmissor ACh, nas sinapses colinérgicas, na ausência e presença de IACHÉ [220].....	20
Figura 11 - Citotoxicidade de células Hep-G2, para extratos e respectivas frações de metanol e água, a concentrações de 0,5 e 1 mg/mL. a-g são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.	43
Figura 12 - Citotoxicidade de células Caco-2, para extratos de Aramé, Nori e <i>Fucus</i> nativos (A, N e F) e purificados: metanol (M) e água (A), a concentrações de 0,5 e 1 mg/mL. a-f são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.	44
Figura 13 - Percentagem da atividade antioxidante para os extratos Aramé, Nori e <i>Fucus</i> e frações purificadas por SPE, fração da água (H ₂ O) e outra fração metanol (MeOH), a uma concentração de 0,25 mg/mL exceto para as amostras do <i>Fucus</i> analisadas a 0,29 mg/mL. As letras a-d correspondem a valores que são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.....	45
Figura 14 - Inibição do AChE para os extratos de algas Aramé (3 mg/mL), Nori (1,5 mg/mL) e <i>Fucus</i> (1,177 mg/mL). a, b, c são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.	46
Figura 15 - Inibição da HMGR para os extratos de algas Aramé, Nori e <i>Fucus</i> a 0,25 mg/mL. a, b, c são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.....	48

Figura 16 – Redução da permeação do colesterol (col) na barreira gastrointestinal na presença de Aramé (A), Nori (N), Fucus (F) e ezetimiba (E), em relação ao colesterol sozinho. a a d são considerados estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.	49
Figura 17 - Percentagem de permeação dos compostos bioativos dos extratos de algas na presença de colesterol e ezetimiba. Onde col é o colesterol; E é a ezetimiba; A é a Aramé; F é o Fucus; e N é a Nori. a - d são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.	51
Figura 18 - Análise dos compostos que variam na presença ou ausência de Aramé, para as células Caco-2, no modo positivo (1) e modo negativo (2). a) gráfico do volcano; b) gráfico PCA; c) gráfico PLS; d) gráfico log ₂ (fold change).	54
Figura 19 - Análise dos compostos que variam na presença ou ausência de Aramé, para as células Hep-G2, no modo positivo (1) e modo negativo (2). a) gráfico do volcano; b) gráfico PCA; c) gráfico PLS; d) gráfico log ₂ (fold change).	55
Figura 20 – Heatmap dos compostos propostos que variam na presença ou ausência de Aramé, nas células Caco-2 (a) modo positivo e (b) modo negativo, com base nas intensidades médias, com intervalo de confiança de 95 %.	56
Figura 21 - <i>Heatmap</i> dos compostos propostos que variam na presença ou ausência de Aramé, nas células Hep-G2 (a) no modo positivo e (b) no modo negativo, com base nas intensidades médias, com intervalo de confiança de 95 %.	57
Figura 22 - Vias metabólicas afetadas pelos compostos propostos, do modo positivo, na presença ou ausência de Aramé, para as células Caco-2 (a) e Hep-G2 (b). Obtidas pelo MetaboAnalyst 5.0 Pathway Enrichment – análise de metabolitos significativamente diferentes entre grupos ($p < 0,05$). A taxa de enriquecimento é calculada como o número de hits entre uma via metabólica particular a dividir pelo número de hits expectável.	58
Figura 23 - Heatmap dos compostos propostos que variam na presença ou ausência de Nori, nas células Caco-2 (a) modo positivo e (b) modo negativo, com base nas intensidades médias, com intervalo de confiança de 95 %.	60
Figura 24 - Heatmap dos compostos propostos que variam na presença ou ausência de Nori, nas células Hep-G2, (a) modo positivo e (b) modo negativo, com base nas intensidades médias, com intervalo de confiança de 95 %.	61
Figura 25 - Vias metabólicas afetadas pelos compostos propostos na presença ou ausência de Nori, para as células Caco-2 (a) e Hep-G2 (b), no modo positivo. Obtidas pelo MetaboAnalyst 5.0 Pathway Enrichment – análise de metabolitos significativamente diferentes entre grupos ($p < 0,05$). A taxa de enriquecimento é	

calculada como o número de hits entre uma via metabólica particular a dividir pelo número de hits expectável.	62
Figura 26 - <i>Heatmap</i> dos compostos propostos que variam na presença ou ausência de Fucus, nas células Caco-2, (a) modo positivo e (b) modo negativo, com base nas intensidades médias, com intervalo de confiança de 95 %.....	64
Figura 27 - <i>Heatmap</i> dos compostos propostos que variam na presença ou ausência de Fucus, nas células Hep-G2, (a) modo positivo e (b) modo negativo com base nas intensidades médias, com intervalo de confiança de 95 %.....	65
Figura 28 - Vias metabólicas afetadas pelos compostos propostos na presença ou ausência de Fucus, para as células Caco-2 (a) e Hep-G2 (b). Obtidas pelo MetaboAnalyst 5.0 Pathway Enrichment – análise de metabolitos significativamente diferentes entre grupos ($p < 0,05$). A taxa de enriquecimento é calculada como o número de hits entre uma via metabólica particular a dividir pelo número de hits expectável.....	66
Figura 29 - Gel de SDS-PAGE obtido com proteínas de células Caco-2, nas seguintes condições: (CF) controlo de Fucus; (F) Fucus; (CN,A) Controlo de Aramé e Nori; (A) Aramé; (N) Nori; e (M) marcador PageRuler Prestained Protein Ladder.....	68
Figura 30 - Gel de SDS-PAGE obtido com proteínas de células Hep-G2, nas seguintes condições: (CN,A) controlo de Aramé e Nori; (A) Aramé; (N) Nori; (M) marcador PageRuler Prestained Protein Ladder; (CF) controlo Fucus; e (F) Fucus.	70
Figura 31 - Membranas da proteína NPC1L1 para células Caco-2 (a) e células Hep-G2 (b). Onde C_F é o controlo de Fucus, F é o Fucus, $C_{N,A}$ é o controlo de Aramé e Nori, A é Aramé, N é Nori e M é o marcador.	71
Figura 32 - Áreas normalizadas das bandas da proteína NPC1L1, para as células Caco-2. Onde C_F é o controlo de Fucus, F é o Fucus, $C_{N,A}$ é o controlo de Aramé e Nori, A é Aramé e N é Nori.	72
Figura 33 - Áreas normalizadas das bandas da proteína NPC1L1, para as células Hep-G2. Onde C_F é o controlo de Fucus, F é o Fucus, $C_{N,A}$ é o controlo de Aramé e Nori, A é Aramé e N é Nori.	72
Figura 34 - Membranas da proteína ABCG5 para células Caco-2 (a) e células Hep-G2 (b). Onde CF é o controlo de Fucus, F é o Fucus, CN,A é o controlo de Aramé e Nori, A é Aramé, N é Nori e M é o marcador.	74
Figura 35 - Áreas normalizadas das bandas da proteína ABCG5, para as células Caco-2. Onde C_F é o controlo de Fucus, F é o Fucus, $C_{N,A}$ é o controlo de Aramé e Nori, A é Aramé e N é Nori.	74

Figura 36 - Áreas normalizadas das bandas da proteína ABCG5, para as células Hep-G2. Onde C _F é o controlo de Fucus, F é o Fucus, C _{N,A} é o controlo de Aramé e Nori, A é Aramé e N é Nori.	75
Figura 37 - Reta de Calibração para a quantificação de fenóis totais, usando FLG como padrão.....	105
Figura 38 - Quantidade de fenóis totais por quantidade de extrato para os extratos e frações de SPE, sendo uma fração da lavagem com água (H ₂ O) e outra fração da extração com metanol (MeOH). As letras a-g correspondem a valores estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95%.....	105
Figura 39 - Reta de Calibração para quantificação de polissacáridos, usando ácido poligalacturónico como padrão.....	106
Figura 40 - Quantidade de polissacáridos por quantidade de extratos para os extratos e frações de SPE, sendo uma fração da lavagem com água (H ₂ O) e outra fração da extração com metanol (MeOH). As letras a-g correspondem a valores estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95%.....	106
Figura 41 - Reta de Calibração para quantificação de proteínas, usando BSA como padrão.....	107
Figura 42 - Cromatogramas obtidos para extrato de Aramé, Aramé MeOH e Aramé H ₂ O. A intensidade para o extrato de Aramé encontra-se representada no eixo esquerdo, e para as frações purificados no eixo direito.	107
Figura 43 - Cromatogramas obtidos para extrato de Nori, Nori MeOH e Nori H ₂ O. A intensidade para o extrato de Nori encontra-se representado no eixo esquerdo, enquanto, os extratos purificados encontram-se representados no eixo direito.	108
Figura 44 - Cromatogramas obtidos para extrato de Fucus, Fucus MeOH e Fucus H ₂ O. A intensidade para o extrato de Fucus encontra-se representado no eixo esquerdo, enquanto, os extratos purificados encontram-se representados no eixo direito.	108
Figura 45 – Espectro UV-Visível do floroglucinol.	109
Figura 46 - Cromatograma do floroglucinol (5 mg/mL) a 265 nm.	109
Figura 47 - Cromatograma obtido para o extrato de Aramé, para um comprimento de onda de 265 nm.	110
Figura 48 - Cromatograma obtido para o extrato de Nori, para um comprimento de onda de 265 nm.	110
Figura 49 - Cromatograma obtido para o extrato de Fucus, para um comprimento de onda de 265 nm.	111
Figura 50 - Reta de calibração para determinar o EC ₅₀ do extrato de Aramé não purificado.	112

Figura 51 - Determinação da velocidade inicial do enzima AChE, na ausência de extrato.	113
Figura 52 - Determinação da velocidade inicial do enzima AChE para o floroglucinol.	113
Figura 53 - Atividade do enzima na presença de Aramé - ensaio 1.	114
Figura 54 - Atividade do enzima na presença de Aramé - ensaio 2.	114
Figura 55 - Atividade do enzima na presença de Aramé - ensaio 3.	115
Figura 56 - Atividade do enzima na presença de Nori - ensaio 1.	115
Figura 57 - Atividade do enzima na presença de Nori - ensaio 2.	116
Figura 58 - Atividade do enzima na presença de Nori - ensaio 3.	116
Figura 59 - Atividade do enzima na presença de Fucus - ensaio 1.	117
Figura 60 - Atividade do enzima na presença de Fucus - ensaio 2.	117
Figura 61 - Atividade do enzima na presença de Fucus - ensaio 3.	118
Figura 62 - Atividade do enzima na presença de floroglucinol - ensaio 1.	118
Figura 63 - Atividade do enzima na presença de floroglucinol - ensaio 2.	119
Figura 64 - Atividade do enzima na presença de floroglucinol - ensaio 3.	119
Figura 65 - Determinação da velocidade inicial do enzima HMGR, na ausência de extrato ou inibidor padrão, para a Aramé.	120
Figura 66 - Determinação da velocidade inicial do enzima HMGR, na ausência de extrato ou inibidor padrão, para a Nori e o Fucus.	120
Figura 67 - Atividade do enzima na presença de pravastatina - ensaio 1.	121
Figura 68 - Atividade do enzima na presença de pravastatina - ensaio 2.	121
Figura 69 - Atividade do enzima na presença de Aramé - ensaio 1.	122
Figura 70 - Atividade do enzima na presença de Aramé - ensaio 2.	122
Figura 71 - Atividade do enzima na presença de Nori - ensaio 1.	123
Figura 72 - Atividade do enzima na presença de Nori - ensaio 2.	123
Figura 73 - Atividade do enzima na presença de Fucus - ensaio 1.	124
Figura 74 - Atividade do enzima na presença de Fucus - ensaio 2.	124
Figura 75 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na ausência das algas comestíveis e ezetimiba.	125
Figura 76 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na ausência das algas comestíveis e ezetimiba.	125
Figura 77 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na presença de ezetimiba.	126
Figura 78 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na presença de ezetimiba.	126

Figura 79 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, apenas na presença da Nori.....	127
Figura 80 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, apenas na presença da Nori.....	127
Figura 81 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na presença da Nori e da ezetimiba.....	128
Figura 82 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na presença da Nori e da ezetimiba.....	128
Figura 83 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, apenas na presença do Fucus.....	129
Figura 84 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, apenas na presença do Fucus.....	129
Figura 85 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na presença do Fucus e da ezetimiba.	130
Figura 86 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na presença do Fucus e da ezetimiba.	130
Figura 87 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, apenas na presença da Aramé.....	131
Figura 88 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, apenas na presença da Aramé.....	131
Figura 89 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, presença da Aramé e da ezetimiba.	132
Figura 90 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, presença da Aramé e da ezetimiba.	132
Figura 91 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação da Nori, ao fim das 6 horas.....	133
Figura 92 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação da Nori, ao fim das 6 horas.....	134
Figura 93 -Cromatograma 1 para a determinação da permeação da Nori, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol.	134
Figura 94 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação da Nori, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol.	135
Figura 95 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação da Nori, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol e ezetimiba.	135
Figura 96 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação da Nori, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol e ezetimiba.	136

Figura 97 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do Fucus, ao fim das 6 horas.....	136
Figura 98 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do Fucus, ao fim das 6 horas.....	137
Figura 99 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do Fucus, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol.	137
Figura 100 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do Fucus, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol.	138
Figura 101 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do Fucus, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol e ezetimiba.	138
Figura 102 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do Fucus, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol e ezetimiba.	139
Figura 103 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação da Aramé, ao fim das 6 horas.....	139
Figura 104 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação da Aramé, ao fim das 6 horas.....	140
Figura 105 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação da Aramé, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol.	140
Figura 106 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação da Aramé, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol.	141
Figura 107 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação da Aramé, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol e ezetimiba.	141
Figura 108 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação da Aramé, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol e ezetimiba.	142
Figura 109 - Análise dos compostos que variam na presença ou ausência de Nori, para as células Caco-2, modo positivo (1) e modo negativo (2). a) gráfico do vulcano; b) gráfico PCA; c) gráfico PLS; d) gráfico log ₂ (fold change).....	146
Figura 110 - Análise dos compostos que variam na presença ou ausência de Nori, para as células Hep-G2, modo positivo (1) e modo negativo (2). a) gráfico do vulcano; b) gráfico PCA; c) gráfico PLS; d) gráfico log ₂ (fold change).....	147
Figura 111 - Análise dos compostos que variam na presença ou ausência de Fucus, para as células Caco-2, modo positivo (1) e modo negativo (2). a) gráfico do vulcano; b) gráfico PCA; c) gráfico PLS; d) gráfico log ₂ (fold change).....	150
Figura 112 - Análise dos compostos que variam na presença ou ausência de Fucus, para as células Hep-G2, modo positivo (1) e modo negativo (2). a) gráfico do vulcano; b) gráfico PCA; c) gráfico PLS; d) gráfico log ₂ (fold change).....	151

Figura 113 - Reta de Calibração do Método de Bradford.	154
Figura 114- Quantidade de proteína, nas células Caco-2, em 150 µL de amostra. Onde CF é o controlo de Fucus; F é fucus; CA,N é o controlo de Aramé e Nori; A é Aramé e N é Nori. a e b são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.....	155
Figura 115 - Quantidade de proteína, nas células Hep-G2, em 150 µL de amostra. Onde CF é o controlo de Fucus; F é fucus; CA,N é o controlo de Aramé e Nori; A é Aramé e N é Nori. a e b são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.....	155
Figura 116 - Perfil das bandas presentes no Marcador do gel de SDS-PAGE obtido com as proteínas extraídas das células Caco-2.....	156
Figura 117 - Curva de calibração do marcador de proteínas do gel obtido a partir das células Caco-2.	156
Figura 118 - Perfil das Bandas do controlo de Fucus e do Fucus, nas células Caco-2.	157
Figura 119 - Perfil das Bandas do controlo de Aramé e de Aramé, nas células Caco-2.	158
Figura 120 - Perfil das Bandas do controlo de Nori e de Nori, nas células Caco-2....	159
Figura 121 - Perfil das bandas presentes no Marcador do gel de SDS-PAGE obtido com as proteínas extraídas das células HepG2.	160
Figura 122 - Curva de calibração do marcador de proteínas do gel obtido a partir das células HepG2.	161
Figura 123 - Perfil das Bandas do controlo de Fucus e do Fucus, nas células HepG2.	162
Figura 124 - Perfil das Bandas do controlo de Aramé e de Aramé, nas células HepG2.	163
Figura 125 - Perfil das Bandas do controlo de Nori e de Nori, nas células HepG2....	164
Figura 126 - Perfil das Bandas da NPC1L1 do controlo de Fucus e Fucus, nas células Caco-2.	165
Figura 127 - Perfil das Bandas da NPC1L1 de Aramé, nas células Caco-2.	165
Figura 128 - Perfil das Bandas da ABCG5 do controlo de Fucus e Fucus, nas células Caco-2.	166
Figura 129 - Perfil das Bandas da ABCG5 do controlo de Nori e Aramé, Nori e Aramé, nas células Caco-2.....	166
Figura 130 - Perfil das Bandas da NPC1L1 do controlo de Fucus e Fucus, nas células HepG2.	167

Figura 131 - Perfil das Bandas da NPC1L1 do controlo de Nori e Aramé, Nori e Aramé, nas células HepG2.....	167
Figura 132 - Perfil das Bandas da ABCG5 do controlo de Fucus e Fucus, nas células HepG2.	168
Figura 133 - Perfil das Bandas da ABCG5 do controlo de Nori e Aramé, Nori e Aramé, nas células HepG2.....	168

Índice de tabelas

Tabela 1 - Peso molecular (MW) das proteínas que se destacaram 2x mais na presença do extrato de Aramé, Nori e Fucus, nas células Caco-2.....	68
Tabela 2 - Peso molecular das proteínas em contacto com os extratos de Aramé, Nori e Fucus que diferiam 2x mais, nas células Hep-G2.....	70
Tabela 3 - Resultados obtidos para a citotoxicidade em células HepG2.	111
Tabela 4 - Resultados obtidos para a citotoxicidade em células Caco-2.	112
Tabela 5 - Resultados obtidos para a permeação e redução da permeação do colesterol na presença da Aramé, Nori e Fucus e da Ezetimiba.....	132
Tabela 6 - Resultados obtidos para a permeação dos compostos bioativos das algas na barreira gastrointestinal.....	142
Tabela 7 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Aramé, no modo positivo, para células Caco-2.....	142
Tabela 8 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Aramé, no modo positivo, para células Hep-G2.....	143
Tabela 9 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Aramé, no modo negativo, para células Caco-2.	144
Tabela 10 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Aramé, no modo negativo, para células Hep-G2.	145
Tabela 11 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Nori, no modo positivo, para células Caco-2.....	148
Tabela 12 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Nori, no modo positivo, para células Hep-G2.....	148
Tabela 13 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Nori, no modo negativo, para células Caco-2.	149
Tabela 14 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Nori, no modo negativo, para células Hep-G2.	149
Tabela 15 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Fucus, no modo positivo, para células Caco-2.....	152
Tabela 16 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Fucus, no modo positivo, para células Hep-G2.....	152
Tabela 17 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Fucus, no modo negativo, para células Caco-2.	153
Tabela 18 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Fucus, no modo negativo, para células Hep-G2.	154
Tabela 19 - Áreas obtidas para o controlo de Fucus (CF) e Fucus (F) e as respetivas áreas normalizadas, nas células Caco-2.....	156

Tabela 20 – Áreas obtidas para o controlo de Aramé (CA) e Aramé (A) e as respetivas áreas normalizadas, nas células Caco-2.....	157
Tabela 21 - Áreas obtidas para o controlo de Nori (CN) e Nori (N) e as respetivas áreas normalizadas, nas células Caco-2.....	159
Tabela 22 - Resultados obtidos para as proteínas das células Caco-2 em contacto com os extratos de Aramé, Nori e Fucus.	160
Tabela 23 - Áreas obtidas para o controlo de Fucus (CF) e Fucus (F) e as respetivas áreas normalizadas, nas células HepG2.	161
Tabela 24 - Áreas obtidas para o controlo de Aramé (CA) e Aramé (A) e as respetivas áreas normalizadas, nas células HepG2.	162
Tabela 25 - Áreas obtidas para o controlo de Nori (CN) e Nori (N) e as respetivas áreas normalizadas, nas células HepG2.	163
Tabela 26 - Resultados obtidos para as proteínas das células Hep-G2 em contacto com os extratos de Aramé, Nori e Fucus.	164
Tabela 27 - Áreas obtidas para o controlo de Fucus (CF), Fucus (F), controlo de Nori e Aramé (CN,A), Aramé (A) e Nori (N) e as respetivas áreas normalizadas, para a proteína NPC1L1, nas células Caco-2.	165
Tabela 28 - Áreas obtidas para o controlo de Fucus (CF), Fucus (F), controlo de Nori e Aramé (CN,A), Aramé (A) e Nori (N) e as respetivas áreas normalizadas, para a proteína ABCG5, nas células Caco-2.....	166
Tabela 29 - Áreas obtidas para o controlo de Fucus (CF), Fucus (F), controlo de Nori e Aramé (CN,A), Aramé (A) e Nori (N) e as respetivas áreas normalizadas, para a proteína NPC1L1, nas células HepG2.....	167
Tabela 30 - Áreas obtidas para o controlo de Fucus (CF), Fucus (F), controlo de Nori e Aramé (CN,A), Aramé (A) e Nori (N) e as respetivas áreas normalizadas, para a proteína ABCG5, nas células HepG2.....	168

Lista de siglas e abreviaturas

ACAT – colesterol aciltransferase do inglês *acetyl-Coenzyme A acetyltransferase*

ACE – enzima conversora da angiotensina

AChE – acetilcolinesterase

ACh – acetilcolina

ACN - acetonitrilo

ATP – trifosfato de adenosina

BSA – albumina do soro bovino

CAT - catalase

ChEBI – Chemical entities of biological interest

CK – creatina cinase

CoA - acetilcoenzima A

DCV – doenças cardiovasculares

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

DTNB - 5-5'-Ditiobis(2- ácido nitrobenóico)

EC₅₀ – concentração eficiente correspondente a 50% de atividade

FBS – soro bovino fetal

FTIR – espectroscopia infravermelha da transformada de Fourier

FDA – *Food and Drug Administration*

GPX – Glutathione peroxidase

HBSS - *Hank's Balanced Salt Solution*

HDL – lipoproteína de alta densidade de colesterol

HPLC-DAD - High-performance liquid chromatography with diode array

HMG - 3-hidroxi-3-metil-glutarilo

HMGR - 3-hidroxi-3-metilglutarilo redutase

IACHÉ – inibidor da acetilcolinesterase

IC₅₀ - concentração inibitória de 50 % do crescimento celular

LCAT – lecitina aciltransferase

LC-MS – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa

LDL – lipoproteína de baixa densidade de colesterol

LDLR – recetor de LDL

Lp a – lipoproteína a

mg – miligrama

mL - mililitro

MMP – matriz metaloproteinase

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

MS – espectrometria de massa

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio

mUA – Unidades de absorvência

MW – peso molecular do inglês *molecular weight*

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NMR – ressonância magnética nuclear

NPC1L1 – proteína de Niemann-pick like 1

NTD – Domínio N-terminal

PBS – tampão fosfato salino do inglês *phosphate buffered saline*

PCA – análise dos componentes principais

PE – equivalentes de ácido poligalacturónico

PGE – equivalentes de floroglucinol

PLS – método dos mínimos quadrados

PSA – persulfato de amónio

RCT - transporte reverso de colesterol

RPMI – *Roswell Park Memorial Institute*

RNS – espécies reativas de azoto

ROS – espécies reativas de oxigénio

S.C. – suspensão celular

SDS-PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilo sulfato de sódio

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

SOD – Superóxido dismutase

SPE – extração em fase sólida

SREBP – elemento regulador do esterol

SSD - Domínio sensor de esterol

TBS – tampão de transferência

TBS-T – tampão de transferência + tween 20

TFA – ácido trifluoroacético

TEMED - N, N, N' N – tetrametiletilenodiamina

Tris - Tris(hidroximetil)aminometano

VLDL – lipoproteína de densidade muito baixa

1. Introdução

1.1. Doenças cardiovasculares e o colesterol

Apesar do progresso na implementação de mudanças no estilo de vida e terapias farmacológicas para a prevenção de doenças cardiovasculares (DCV), estas permanecem a principal causa de morte em todo o mundo [1]. As DCV são responsáveis por mais de quatro milhões de mortes na Europa todos os anos. Estas doenças matam mais mulheres (2,2 milhões) do que homens (1,8 milhões), embora as mortes por DCV antes dos 65 anos sejam mais comuns em homens (490 000 vs 193 000) [2].

Um dos fatores de risco para as DCV é a hipercolesterolemia, que se caracteriza por elevadas taxas de colesterol no sangue [3].

O colesterol é um lípido, do grupo dos esteróides, que desempenha um papel fundamental em muitos processos bioquímicos e biofísicos. Juntamente com os fosfolípidos, o colesterol é um componente fundamental das membranas dos animais sendo essencial para manter a fluidez da membrana e o precursor de várias hormonas esteróides, sais biliares e vitamina D [3]. Apesar de o colesterol desempenhar um papel insubstituível na saúde humana, os níveis elevados de colesterol circulante no plasma, são devidos a uma desordem do metabolismo e/ou nutrição, conhecida como hipercolesterolemia. O colesterol, sendo uma substância lipídica apolar, é transportado no plasma associado a várias partículas de lipoproteínas, que para além de colesterol contêm triglicéridos, proteínas, em diferentes níveis. As duas principais formas de colesterol encontradas em circulação são as lipoproteínas de baixa densidade de colesterol (LDL) e as lipoproteínas de alta densidade de colesterol (HDL) [4, 5]. Uma das principais causas para a doença coronária do coração e outras DCV é o elevado colesterol circulante, podendo formar-se depósitos de placas de ateromas, nas paredes das artérias, dificultando a passagem do sangue, uma condição conhecida como aterosclerose [6]. Consequentemente a hipercolesterolemia é um dos fatores de risco das DCV juntamente com outros fatores de risco comportamentais como uma dieta pouco saudável, o sedentarismo, o tabagismo e o consumo habitual de álcool. A OMS refere que deixar de fumar, uma atividade física regular e a prevenção do uso nocivo de bebidas alcoólicas bem como alterações nos hábitos alimentares, diminuem o risco de doenças cardiovasculares [7]. Essas mudanças na dieta e hábitos de vida são recomendações não somente para a prevenção de DCV, mas também para a utilização combinada com as terapias de redução do colesterol circulante [8]. No caso da alimentação saudável, nomeadamente a redução do consumo de sal e de gordura saturada e aumentar o consumo de frutas, vegetais e outros produtos naturais de origem

não animal, é amplamente reconhecida como uma estratégia para a gestão/ controlo das DCV, quer na prevenção, quer associadas às diferentes abordagens terapêuticas. [9, 10].

1.2. Colesterol: absorção, homeostase e metabolismo

Os níveis de colesterol endógenos estão relacionados com a biossíntese do colesterol, com vias de absorção e excreção do colesterol, isto é, a concentração de colesterol circulante depende dos níveis de colesterol sintetizado pelo fígado, absorvido pelo intestino e com a sua excreção por conversão em ácidos biliares [11, 12]. Sabe-se que, mais de metade do colesterol do organismo é devido à biossíntese e o restante pela dieta, sendo absorvido no intestino [13]. A homeostase do colesterol é, portanto, controlada pela síntese endógena, absorção e excreção intestinal e hepática. Um desequilíbrio destes processos pode levar à acumulação de colesterol circulante, levando à formação de ateromas e, conseqüentemente ao aparecimento de DCV [14].

Como foi referido anteriormente, os lípidos, como é o caso do colesterol, circulam na corrente sanguínea, ligados a proteínas formando as lipoproteínas. Estas consistem em partículas formadas por uma capa hidrofílica constituída por fosfolípidos e apoproteínas, envolvendo um núcleo hidrofóbico que contém triglicéridos e colesterol esterificado [15, 16].

As quatro classes principais de lipoproteínas que estão presentes no plasma são: HDL, LDL, lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL) e quilomícra [17]. As lipoproteínas diferem nas apoproteínas que as compõe e os tipos de lípidos que transportam [18].

As HDL são formadas por estéres de colesterol e apoproteínas, sendo a apo A-I a sua principal apoproteína, e algumas das proteínas que a constituem apresentam atividade enzimática, como é o caso da lecitina-colesterol-acil-transferase (LCAT). Enquanto, as LDL são compostas por estéres de colesterol e uma só proteína, a apo B-100. Já as VLDL são produzidas no fígado e caracterizam-se pelo alto conteúdo em triglicéridos, nesta lipoproteína a principal apoproteína é a apo B-100. Por fim, os quilomícra são sintetizados nas células da mucosa intestinal, são compostos por triglicéridos e uma pequena quantidade de estéres de colesterol derivados da gordura ingerida na dieta, neste caso a principal apoproteína que os compõe é a apo B-48 [18].

O fígado é o órgão responsável pela homeostase do colesterol, regulando a síntese e a eliminação de uma proporção significativa do colesterol no organismo [19]. Os

hepatócitos expressam uma série de recetores de lipoproteínas incluindo o recetor de lipoproteínas de baixa densidade (LDLR), a proteína-1 relacionada ao LDLR1 e o recetor eliminador de classe B tipo I (SR-B1), que os permite internalizar o colesterol de praticamente todas as lipoproteínas, isto é, limpa os remanescentes de quilomícras contendo colesterol e partículas de lipoproteínas de baixa densidade do plasma e é o principal responsável pela formação de HDL. Apesar de o colesterol também ser sintetizado de novo no fígado de uma forma regulada [20], este pode eliminar quantidades significativas de colesterol, usando duas vias: (1) dentro da VLDL, rica em triglicéridos, fornecendo às células periféricas ácidos gordos, vitaminas lipossolúveis e colesterol [20, 21]; (2) por secreção na bilis diretamente como colesterol circulante ou após conversão em ácidos biliares, [22, 23] proporcionando assim um meio de eliminação irreversível do colesterol pelas fezes [24, 25].

1.2.1. Biossíntese do colesterol

O colesterol é um esteroide da família dos esteroides com 27 carbonos, com fórmula química de $C_{27}H_{46}O$, que consiste em quatro anéis, denominado ciclopentanoperidrofenantreno [26], e uma cadeia lateral, como está representado na Figura 1 [13].

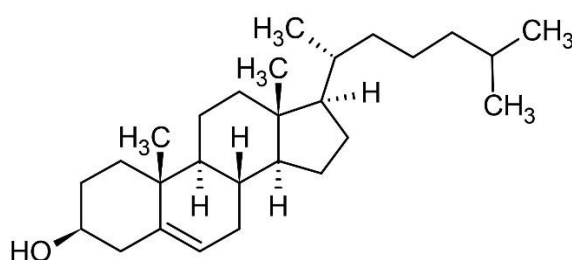


Figura 1- Molécula de colesterol, Código do Humam Metabolome Database (HMDB) - HMDB0000067. [6]

A biossíntese do colesterol de novo ocorre maioritariamente no fígado por um processo que está dividido em cinco etapas (Figura 2), nomeadamente: [13]

1ª etapa – via do mevalonato: Primeiramente duas moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA) condensam formando o acetoacetil-CoA, reação que é catalisada pela tiolase citosólica. De seguida, ocorre a condensação do acetoacetil-CoA com a acetil-CoA e, esta reação é catalisada pelo enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG)-CoA sintase, formando o HMG-CoA. Este é reduzido a mevalonato numa reação catalisada pelo HMG-CoA redutase (HMGR) e pelo coenzima fosfato de dinucleótido de

nicotinamida e adenina (NADPH). A reação catalisada pelo HMGR constitui a etapa regulatória da via de síntese de novo colesterol [13].

2ª etapa – formação de unidades terpenos a partir do mevalonato por perda de CO₂ [13];

3ª etapa – condensação de seis unidades terpenos de esqualeno [13];

4ª etapa – ciclização de esqualeno para formação do lanosterol [13];

5ª etapa – formação do colesterol a partir do lanosterol [13].

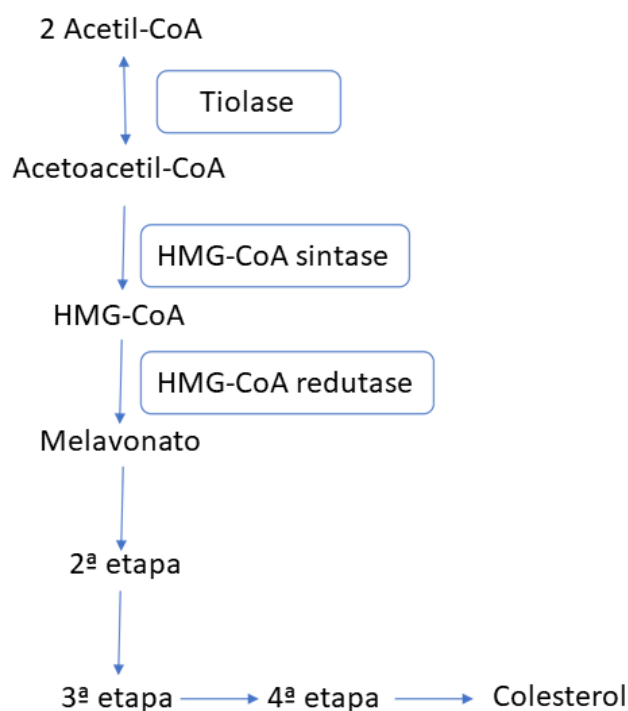


Figura 2 - Esquema da biossíntese do colesterol, adaptado de [13].

É importante notar que o HMGR é a proteína alvo dos fármacos, conhecidos como estatinas, para diminuir a quantidade de colesterol circulante [27, 28, 29, 30]. O HMGR é uma glicoproteína transmembranar com 888 aminoácidos de comprimento.

O centro ativo do HMGR, é formado por duas subunidades diferentes que formam um dímero, é constituído por uma grande cavidade localizada na interface monómero-monómero e pode ser dividido em três subcentros de ligação: um para HMG, um para a CoA e outro para o NADPH [31].

O HMGR é um dos enzimas mais regulados no corpo humano e, essa regulação pode ser alcançada de quatro maneiras diferentes: transcrição do gene da enzima [32], tradução do seu mRNA [33], degradação da enzima funcional [34], e modulação da sua atividade [35]. Os ácidos biliares, o mevalonato e o colesterol inibem retroativamente o HMGR [27].

Além dos fármacos, como as estatinas, já foram identificados inibidores deste enzima presentes em plantas, vegetais e frutos [36, 37]. Depois de alguns estudos, a curcumina, o docosanol e o ácido salvinólico c, demonstraram em ensaios *in vitro* ter o poder de inibir o HMGR [38]. *In vivo*, o resveratrol demonstrou inibir o HMGR, levando à diminuição do colesterol total em estudos utilizando ratos [39]. É de salientar que, *in vitro* utilizando linhas celulares humanas, extratos das folhas de *Vernonia condensata* [40] também apresentam atividade inibitória da HMGR. Em relação às algas marinhas, os extratos de *Gracilaria lemaneiformis* e *Saccharina japonica*, demonstraram ter atividade de inibição da HMGR em ratos *in vivo* [41, 42]. Os extratos das algas marinhas, *Caulerpa lentillifera* e *Kappapycus alvarezii* também foram reportados como apresentando compostos com capacidade de inibir a HMGR, estes resultados foram obtidos com ensaios *in vitro* utilizando células humanas [43]. Outros estudos demonstraram que extratos de *Fucus vesiculosos* apresenta atividade inibitória da HMGR [44], no entanto para as algas *Porphyra* spp. e para a *Eisenia bicyclis* não há ainda conhecimento público de estudos sobre a capacidade de inibir este enzima, mas o grupo de investigação já estudou estes extratos de algas.

1.2.2. Proteínas transportadoras de colesterol

▪ ATP-Binding Cassette G5/G8 (ABCG5, ABCG8)

Os transportadores *ATP-Binding cassette*, constituem um grupo de proteínas de transporte transmembranar celular altamente conservadas que usam ATP para gerar a energia necessária para transportar metabolitos através das membranas [45].

A superfamília de transportadores ABC tem grande impacto sobre o metabolismo de lipoproteínas e do colesterol: os transportadores ABCG5 e ABCG8 são heterodímeros expressos principalmente no fígado e no intestino delgado e têm como função a proteção do organismo contra a acumulação de esteróis. Especificamente, exportam esteróis para a bilis, favorecendo a sua excreção, enquanto, que no intestino delgado excretam os esteróis ao lúmen intestinal, impedindo a sua absorção [45, 46].

Mutações nestes transportadores, ABCG5/G8, causam uma doença genética, denominada de sitosterolemia, que é caracterizada por elevados níveis plasmáticos de esteróis e colesterol circulante [45, 46].

Estes dois transportadores estão em oposição direta ao transportador NPC1L1 e, que é um transportador do efluxo de colesterol não esterificado presente nas membranas das células do intestino e do fígado [47, 48].

- **Niemann-Pick C1 like 1 (NPC1L1)**

O transportador NPC1L1 é uma proteína transmembranar politópica composta por 1332 resíduos de aminoácidos e é essencial na absorção do colesterol no intestino delgado [19]. Este transportador é encontrado, principalmente, nas regiões expostas ao colesterol circulante: a membrana apical dos enterócitos e a membrana canalicular dos hepatócitos [19].

A regulação da localização do NPC1L1 é um processo dependente do colesterol, isto é, quando o colesterol é abundante na célula, o NPC1L1 é encontrado no endossomo para sofrer reciclagem; quando o colesterol não é abundante na célula, o NPC1L1 é encontrado na membrana plasmática a fim de capturar o colesterol para a célula [19].

Esta proteína é o alvo molecular para a redução da absorção de colesterol no intestino pelo fármaco ezetimiba [49]. O mecanismo de ação da ezetimiba, embora não totalmente compreendido, envolve a inibição seletiva da absorção do colesterol. A absorção de nutrientes lipossolúveis, como é o caso de vitaminas lipossolúveis, triglicéridos ou ácidos biliares, não é afetada [50].

1.2.3. Absorção intestinal do colesterol

No intestino, a absorção do colesterol proveniente da dieta é um processo de várias etapas, no qual o colesterol é micelizado por ácidos biliares no lúmen intestinal, captado pelos enterócitos, colocado em lipoproteínas e transportado para a linfa e sistema circulatório [51].

A absorção do colesterol no intestino delgado começa com a sua incorporação em micelas, que contêm ácidos biliares, fosfolípidos e produtos hidrofílicos de triglicéridos. Esta etapa permite a solubilização do colesterol e de outros nutrientes lipossolúveis, o que é essencial para a movimentação através da camada de água que fica antes da membrana apical dos enterócitos. Aqui, o colesterol não esterificado é incorporado pela membrana celular dos enterócitos, através da NPC1L1 [19]. O colesterol não

esterificado que entra no enterócito pode ser excretado de volta para o lúmen intestinal, este transporte é mediado pelo ABCG5/G8 (Figura 3) [52, 53, 19].

Dentro do enterócito, a maior parte do colesterol circulante é esterificado no retículo endoplasmático pela acetil-CoA acetiltransferase 2 (ACAT2). Isso permite que os quilomícras incorporem o colesterol esterificado, triglicéridos, e algum colesterol circulante exportando-os para a circulação sanguínea [54, 55]. Na corrente sanguínea, a lipoproteína lipase hidrolisa os triglicéridos no núcleo dos quilomícras permitindo a sua absorção pelos tecidos periféricos (adiposo e muscular). Após este processo enzimático, os remanescentes de quilomícras que permanecem são absorvidos pelos hepatócitos [19].

1.2.4. Transporte reverso

O colesterol dos tecidos periféricos é transportado por uma via denominada transporte reverso de colesterol (RCT), que transporta o colesterol dos tecidos não hepáticos para o fígado para metabolismo e eliminação biliar nas fezes [54] (Figura 3).

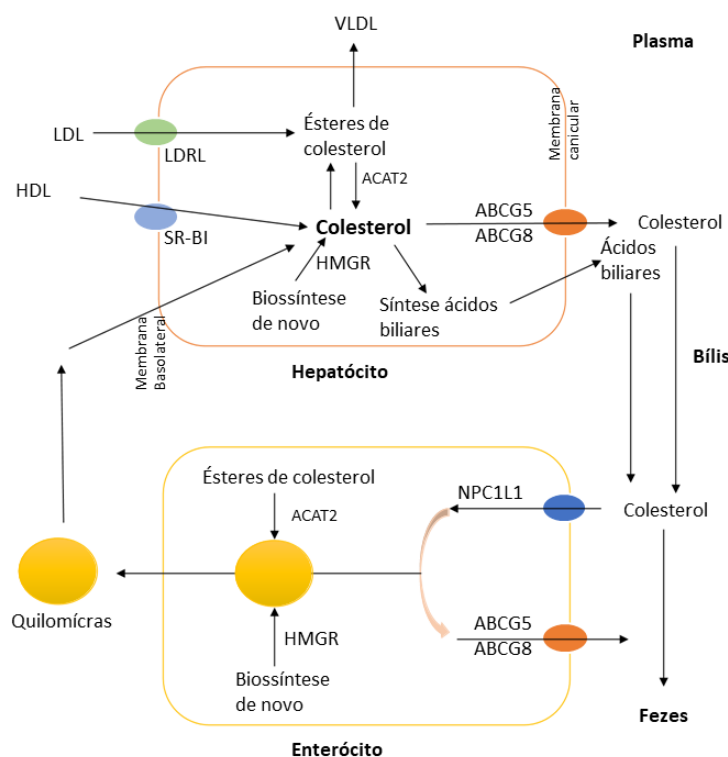


Figura 3 – Absorção intestinal e transporte reverso do colesterol – Esquema das proteínas de transporte de colesterol nos hepatócitos e enterócitos, adaptado de [56].

A principal lipoproteína envolvida no efluxo de colesterol dos tecidos periféricos para retornar ao fígado é a HDL. No fígado, o colesterol das HDL, esterificado pela sua lecitina – colesterol aciltransferase (LCAT), pode seguir duas vias: (1) via direta na qual

as HDL se ligam ao transportador *scavenger receptor, class B type I* (SR-B1) com alta afinidade permitindo transferir todo o seu conteúdo em colesterol para o hepatócito; (2) via indireta, na qual o colesterol esterificado das HDL é inicialmente transferido para a apo B-100 para VLDL ou LDL em troca de moléculas de triglicéridos [54, 57]. Estes processos permitem o movimento do colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, onde o colesterol pode ser convertido a ácidos biliares e excretado, via bilis ou fezes, ou ser metabolizado para a síntese de hormonas esteróides [58, 59].

1.3. Terapêutica para o controlo da hipercolesterolemia

Como referido anteriormente, os fármacos habitualmente utilizados na redução do colesterol endógeno são as estatinas, que atuam inibindo o enzima da biossíntese de novo colesterol o HMGR e/ou a ezetimiba que, inibe o transportador NPC1L1 o que pretende reduzir o colesterol exógeno absorvido pelo intestino [16].

1.3.1. Mecanismo ação das Estatinas

As estatinas reduzem a síntese de colesterol novo no fígado ao inibir de forma competitiva o enzima HMGR, a etapa limitante da atividade de biossíntese do colesterol. Podem ser divididas em dois tipos, consoante a sua origem [60, 61, 62]. As estatinas do tipo I, como por exemplo, lovastatina, pravastatina e sinvastatina, são produtos fúngicos naturais e as estatinas do tipo II que são totalmente sintéticas [63].

As estatinas inibem o HMGR ligando-se ao centro ativo do enzima, evitando pelo impedimento estéreo, a ligação do substrato HMG-CoA, mas nenhuma porção do centro de ligação do NADPH é ocupado pelas estatinas, ou seja, as estatinas inibem competitivamente o HMG-CoA sem afetar a ligação do NADPH [64]. Sabe-se que, mesmo que o grupo hidrofóbico das estatinas seja muito diferente da porção CoA do substrato, estas também bloqueiam o acesso do HMG-CoA ao centro de ligação. Assim, a afinidade do enzima para as estatinas é ligeiramente maior que a afinidade para o substrato [65]. Em resumo, os grupos hidrofóbicos volumosos das estatinas ocupam o centro de ligação de HMGR e a parte da superfície de ligação para a porção CoA do substrato, bloqueando o acesso do substrato. Os grupos hidrofóbicos rígidos das estatinas são acomodados num local não polar que se forma quando há o rearranjo da ligação [66].

A inibição do enzima HMGR leva à redução da biossíntese de novo colesterol, e promove o aumento da expressão do recetor de LDL (LDLR) na superfície dos hepatócitos. Os LDRL medeiam a endocitose das lipoproteínas LDL contendo colesterol,

o seu aumento nos hepatócitos, aumenta a sua excreção ou metabolização no fígado resultando na redução do colesterol circulante [16].

Os diferentes tipos de estatinas diferem na sua absorção, biodisponibilidade, ligação às proteínas plasmáticas, excreção e lipofilicidade. A lovastatina e sinvastatina são pró-fármacos, enquanto as outras estatinas disponíveis são administradas na sua forma ativa. A sua biodisponibilidade é relativamente baixa, devido a sofrerem metabolismo hepático significativo. Embora as estatinas sejam geralmente muito bem toleradas, podem provocar hepatotoxicidade ou toxicidade renal, também são conhecidos outros efeitos adversos na homeostasia da glicose, podendo provocar diabetes *mellitus* tipo 2, outros efeitos específicos nos músculos, podendo provocar derrame hemorrágico, níveis elevados de creatina quinase (CK) e ainda efeitos neurológicos e neurocognitivos [67, 68, 69]. Apesar dos mecanismos associados aos efeitos adversos das estatinas não terem sido ainda totalmente elucidados, a comunidade médica e científica aponta para a necessidade urgente de identificar os indivíduos que, apresentam risco aumentado de apresentar efeitos secundários decorrentes da sua toma, e de encontrar terapias alternativas a estes fármacos [70].

1.3.2. Mecanismo de ação da Ezetimiba

O alvo molecular da ezetimiba é o transportador de esteróis, o transportador NPC1L1, que está envolvido na absorção do colesterol e outros esteróis, como fitoesteróis obtidos pela dieta [16]. Nos dias de hoje, ainda não é totalmente conhecido o mecanismo de ação da ezetimiba.

O autor Bays, H. (2002) [71], refere que o mecanismo de ação parece ser semelhante ao que seria de esperar através da inibição de um transportador de colesterol. A ezetimiba sofre glucuronidação no fígado formando o metabolito conjugado ezetimiba-glucuronido, farmacologicamente ativo [72]. Cerca de 90% da ezetimiba e/ou o seu metabolito conjugado são excretados nas fezes e na urina [73]. O metabolito conjugado circula entero-hepaticamente, onde é repetidamente enviado ao intestino, o seu local de ação [74]. Esta reciclagem entero-hepática é responsável pela longa duração de ação da ezetimiba [73].

Segundo os autores Better, J., L. *et al* (2010) [75], a ezetimiba liga-se diretamente ao NPC1L1, e a sua localização foi mapeada para o segundo *loop* extracelular do transportador [24]. Esta ligação pode resultar em alterações conformacionais do

transportador, perturbando as interações do NPC1L1 com o colesterol circulante e, em última análise, inibir a endocitose do NPC1L1 induzida pelo colesterol [76, 77].

Os autores Huang, C. *et al* (2020) [78], para investigarem o local de ligação da ezetimiba e o seu mecanismo de ação, determinaram a estrutura da proteína NPC1L1 com um complexo análogo da ezetimiba. As estruturas obtidas pelos autores, apresentaram dois estados importantes dentro do ciclo de captação de colesterol. A estrutura da forma apo NPC1L1 representa um estado aberto da proteína, que tem a cavidade de ligação ao colesterol no domínio N-terminal (NTD) aberta para receber o colesterol micelar no intestino delgado. A estrutura da proteína ligada ao análogo da ezetimiba representa um estado fechado de NPC1L1, que possui o túnel completo do NTD ao domínio sensor de esterol (SSD) para a libertação do colesterol do lúmen para a membrana plasmática [78]. Para concluir, os autores acham que é provável que a ezetimiba se ligue a este local no estado aberto do NPC1L1, conseqüentemente, obstrui o movimento do colesterol no túnel de distribuição, impedindo a sua absorção [78].

A ezetimiba inibe a captação intestinal de colesterol dietético e biliar ao nível da membrana apical dos enterócitos, por interação com o transportador NPC1L1, sem afetar a absorção de outros nutrientes lipossolúveis. Ao inibir a absorção intestinal do colesterol, a ezetimiba reduz a quantidade de colesterol circulante, e em resposta a esta redução o fígado regula positivamente a expressão da proteína LDLR, o que, por sua vez, leva ao aumento da eliminação do colesterol circulante do sangue, como referido [16].

A insuficiência hepática com risco de vida com ezetimiba é extremamente rara [79], no entanto, a monoterapia com ezetimiba tem baixa eficácia, uma vez que, apenas consegue reduzir o colesterol circulante em 15-20% [80, 81].

1.3.3. Combinação de Ezetimiba e Estatinas

A ezetimiba tem um excelente perfil de tolerabilidade e foi considerado seguro quando administrado como monoterapia, bem como quando usado em combinação com estatinas [71]. Como referido anteriormente, a monoterapia com ezetimiba tem baixa eficácia, então, ao combinar com as estatinas a sua eficácia aumenta para uma diminuição do colesterol circulante de 5-10% [81, 82]. Pensa-se que a coadministração de ezetimiba com uma estatina bloqueia a absorção do colesterol dietético e biliar no intestino, enquanto, atenua o aumento subsequente da síntese de novo do colesterol

hepático associado à depleção do colesterol intra-hepático. O grau de redução de lípidos varia com a dose e o tipo de estatina [83].

Goldberg, A., C. *et al* (2004) [83], compararam a eficácia da coadministração da ezetimiba com duas estatinas, a sinvastatina e a atorvastatina, em pacientes com hipercolesterolemia. A ezetimiba com a sinvastatina reduziram os níveis de colesterol nas LDL, colesterol total, triglicéridos e apoB em maior extensão que a sinvastatina isolada. A ezetimiba e a atorvastatina melhoraram significativamente os níveis do colesterol das LDL e HDL, dos triglicéridos e do colesterol total em comparação com a atorvastatina sozinha. Comparando ainda as duas estatinas, a sinvastatina produziu maiores reduções de LDL do que a atorvastatina [83]. A adição de ezetimiba à terapia com estatinas não parece aumentar a incidência de níveis elevados de creatina quinase (CK) além do que é observado com o tratamento com estatinas [79].

Como referido, os problemas e efeitos adversos associados a estes e outros fármacos têm motivado a procura de terapias auxiliares ou alternativas. Dado que a sociedade tem uma opinião muito favorável sobre produtos naturais, tem sido motivada a procura de produtos ou alimentos funcionais, que por conterem ingredientes como compostos bioativos, podem ser usados para a gestão/controlo de doença, como as DCV, ou, possam ter efeitos benéficos sobre a saúde de um modo geral.

1.4. Algas comestíveis como fonte de compostos bioativos

A ingestão de certos produtos naturais, em combinação com fármacos anti-hiperlipidémicos tem sido frequentemente reportada como uma estratégia para a terapia da hipercolesterolemia. Assim, tem existido um aumento no interesse em algas, devido aos seus compostos bioativos, uma vez que, apresentam propriedades favoráveis para a saúde [84], e têm demonstrado potencial de aplicação nas indústrias de alimentos funcionais e nutracêuticos, com o intuito de o seu consumo poder diminuir os fatores de risco metabólicos, como a hiperglicemia, a hipercolesterolemia e a hiperlipidemia [84]. Os compostos das algas com interesse industrial incluem polissacáridos (por exemplo, alginato e fucoidano), proteínas (por exemplo, ficobiliproteínas), polifenóis (por exemplo, florotaninos), carotenóides (por exemplo, a fucoxantina) e ácidos gordos polinsaturados de cadeia longa n-3 (por exemplo, ácido eicosapentaenóico) [85].

As algas são taxonomicamente classificadas em três grupos principais:

- *Chlorophyceae* – algas verdes;
- *Rhodophyceae* – algas vermelhas;

- *Phaeophyceae* – algas castanhas [86].

Algumas algas têm sido usadas na alimentação humana apresentando-se como uma fonte rica e sustentável de macronutrientes e micronutrientes para a dieta humana [87]. Os micronutrientes são constituídos por minerais, nomeadamente ferro e magnésio, e vitaminas lipo e hidrosolúveis. Em relação aos macronutrientes, as algas são fonte de proteínas, contêm todos os aminoácidos essenciais e polissacáridos sulfatados, que variam de acordo com os filos [88].

As algas contêm várias vitaminas [89], polissacáridos [90], proteínas [91], compostos fenólicos [92], ácidos gordos [93], lípidos [93], esteróis [94], alcalóides [95] e flavonóides [96]. Frequentemente, associadas à presença destes compostos, descritos como bioativos, têm surgido evidências que as algas comestíveis e os respetivos extratos apresentam atividades antioxidantes [97], antitumorais [98], antimicrobianas [99], anti-inflamatórias [100] e propriedades antidiabéticas [101].

O consumo das algas tem aumentado, nomeadamente das algas marinhas: bodelha (*Fucus vesiculosus*), Nori (*Porphyra* spp) e Aramé (*Eisenia bicyclis*), uma vez que o seu consumo tem sido reportado como apresentando vantagens para a saúde, para além de que são um recurso marinho abundante e fontes alternativas ao consumo de produtos de origem animal.

1.4.1. *Porphyra* spp.

A *Porphyra* spp. também é conhecida como Nori (Figura 4), é uma macroalga marinha vermelha com alto teor de proteína e em forma de folha de talo [102, 85]. Esta alga é um alimento tradicional considerado saudável em países asiáticos, usada para fazer sopas e sushi [103]. A Nori é também considerada benéfica para reduzir o açúcar no sangue [104]. É de cor vermelha devido à presença do pigmento ficoeritrina [105], que reflete a luz vermelha e absorve a luz azul. Esta alga pode fazer a fotossíntese e viver em maiores profundidades do que outras algas pois, a luz azul passa na água a uma maior profundidade [106].



Figura 4 - Alga *Porphyra* spp., conhecida como Nori. [107]

A Nori seca é descrita como contendo vários nutrientes, como proteínas, ácidos gordos polinsaturados, minerais, vitaminas e hidratos de carbono, e compostos

bioativos, nomeadamente, compostos fenólicos [108, 109]. Esta alga foi descrita como apresentando diversas atividades, nomeadamente, anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e melhorar o metabolismo lipídico, devido à presença de polissacáridos, péptidos bioativos, aminoácidos como a micosporina, ficobiliproteínas e compostos fenólicos que estão na sua constituição [109, 110].

Os ácidos gordos descritos como presentes nesta alga são o ácido eicosapentaenóico e o ácido palmítico. O primeiro foi descrito como apresentando, no óleo de peixe, benefícios cardiovasculares uma vez que, tem efeito como mediador biológico [111].

Os polissacáridos sulfatados que foram identificados nesta alga, são denominados como porfiranos. Estes apresentam descritas diversas propriedades, nomeadamente, atividade antitumoral [112], antioxidante [113], imunoregulatória [114], anticoagulante [115], imunomoduladora [116] e melhora o metabolismo dos lípidos [117], da glucose [118] e deficiência em ferro [119]. Nas algas vermelhas também têm sido reportados outros polissacáridos, como é o caso da celulose, xilanos e mananos que são pouco solúveis em água [120].

Os péptidos bioativos identificados nesta alga, foram descritos como tendo propriedades de anti-hipertensão, antioxidante, antidiabéticas [121], anticoagulante [122] e imunomodulador [123]. O péptido PPY (Prolina- prolina – tirosina) foi descrito como tendo um papel antitumoral ativando a apoptose [124, 125]. Outro péptido descrito nesta alga, o PY-PE, este apresentou um efeito proliferativo nas células epiteliais intestinais [126]. Vários péptidos presentes nesta alga apresentaram atividade inibitória da enzima conversora da angiotensina (ACE) contribuindo para a regulação da pressão sanguínea [127]. O dipéptido, anserina, (β - alanil- N- metil histidina) foi também identificado apresentando atividade antioxidante [128].

Os aminoácidos como as micosporinas identificados nesta alga foram descritos como apresentando atividade antioxidante [129], cicatrizante de feridas [130], imunomoduladora [131], reduzindo as espécies reativas de oxigénio (ROS), os danos no DNA e a peroxidação lipídica [132], aumenta os níveis de protocollagénio, colagénio I e elastina, na matriz extracelular [133].

São conhecidas duas ficobiliproteínas na Nori, a ficoeritrina e a ficocianina, que são proteínas coletoras de luz. No caso da ficobiliproteína foi descrita como apresentando

diversas atividades, como hepatoprotetiva [134], antioxidante [134], anti-envelhecimento [135], anti-inflamatória [136], antioxidante [118] e imunomoduladora [137].

Existem dois tipos de compostos fenólicos identificados na Nori (Figura 5), (1) os florotaninos (floroglucinol - 1,3,5-trihidroxibenzeno) que são descritos, como tendo atividade antioxidante e protegem contra os danos da luz UV [138, 139]. Nas algas castanhas, são descritos como tendo atividade contra a carcinogênese cutânea induzida por UV-B71 e inibição da degradação de colagênio na pele [140]; e (2) a taurina que é descrita, como tendo, nos humanos, atividade antioxidante, neurotransmissor e modulador de níveis de cálcio [138, 139].

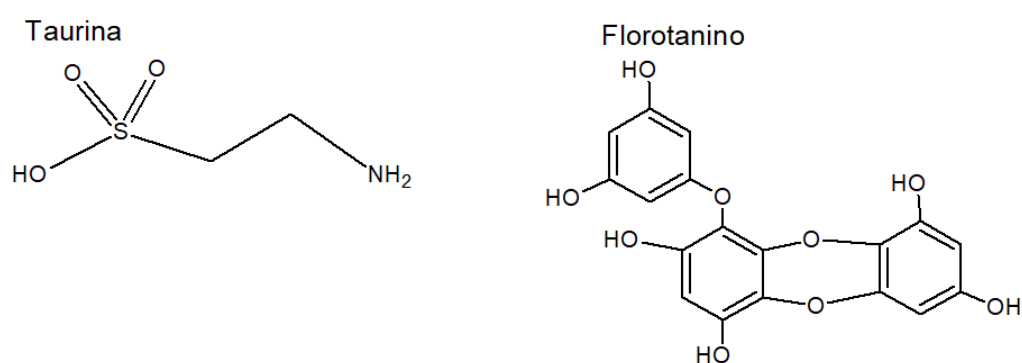


Figura 5 - Estrutura dos compostos fenólicos identificados na Nori, Taurina e o florotanino: floroglucinol -trihidrobzeno.

Apesar dos compostos bioativos, presentes na Nori, terem sido descritos como exibirem várias atividades farmacológicas como imunomodulação, antitumoral, anti-hiperlipidêmica e atividade antioxidante, indicando que é benéfica para a saúde humana são necessárias mais evidências desses efeitos benéficos em estudos humanos, uma vez que, não há ensaios que os comprovem [110].

A Nori, incluída em carne de porco restruturada, já foi usada em estudos para avaliar a redução da hipercolesterolemia e a permeação do colesterol na barreira gastrointestinal, em animais, nomeadamente em ratos [141, 142, 143], onde se verificou que, os ratos que consumiram Nori apresentavam menor quantidade de colesterol do que o controlo e que esta alga melhora o metabolismo de lipoproteínas.

1.4.2. *Fucus vesiculosus*

O *Fucus vesiculosus* (Figura 6), também conhecido como bodelha é uma alga castanha multicelular macroscópica e é caracterizada, no seu estado adulto, por talos divididos por uma nervura central, com pequenos aerocistos com gás que ocorrem em pares, isto é, um de cada lado da nervura [144], que permitem que a alga flutue, facilitando a captura da luz para a fotossíntese [145]. Esta alga cresce em zonas de maré média com elevada salinidade, águas frias e substrato rochoso, especialmente no hemisfério norte [145].

algaeBASE



Figura 6 - *Fucus vesiculosus*, [107].

A composição química desta alga depende do local da colheita, localização geográfica e fator ambiental, como firmeza do substrato, exposição ao gelo e ondas, salinidade, força de onda, luz ou competição entre macroalgas [146, 147]. No entanto, esta é essencialmente constituída por compostos fenólicos, proteínas, minerais como iodo, vitaminas, ácidos gordos e polissacáridos sulfatados [146, 148].

Os compostos fenólicos presentes são maioritariamente florotaninos, nomeadamente derivados de floroglucinol [149], estes apresentaram, nas algas castanhas, atividades como antioxidante [150], antibacteriana [151], antidiabética [152], anti-inflamatórias, anticancerígenas, anti-obesidade [153], anti-lipidémica [154] e anti-hipertensivas [155].

Estas algas contêm péptidos que demonstraram uma série de atividades *in vitro*, tais como antimicrobiana, anti-hipertensiva, anticoagulante e anticancerígena. Alguns estudos descreveram que os péptidos, provenientes de peixes, eram capazes de diminuir os níveis de colesterol no plasma [156, 157] e péptidos, provenientes de ovos de galinha, apresentaram atividade antioxidante [158].

Em relação aos minerais, o *Fucus* apresenta baixas taxas de sódio/ potássio (Na/K), o que pode ajudar a manter a saúde cardiovascular, uma vez que o consumo de alimentos com pouco sal é reportado como uma forma de prevenção das DCV. O *Fucus* é rico em iodo, que é reportado como o responsável pela síntese das hormonas da tiróide e que, conseqüentemente, regulam o organismo e a maturação dos órgãos [159,160].

Os polissacáridos sulfatados, identificados no *Fucus* são o fucoidano e a fucoxantina que fazem parte da classe dos fucanos (Figura 7) [161, 162]. Estes compostos têm chamado a atenção por apresentar propriedades antialérgicas, antioxidante [163] reportadas para a alga castanha *Sargassum vulgare*, [163], antiviral, reportada para a

alga castanha *Sargassum swartzii* [164], antitumoral, reportada para as algas castanhas [165, 166], anti-obesidade, reportada para a alga castanha *Sargassum henslowianum* [167], antidiabético [168], anti-envelhecimento, antimicrobiana, anticoagulante, anti-inflamatória, reportadas para algas castanhas [169]. Os polissacáridos como os fucanos e a laminarina (Figura 7) têm atividades antivirais. Os fucanos para os vírus HIV-1, HSV-1 e HSV-2. A laminarina para o vírus HIV [170].

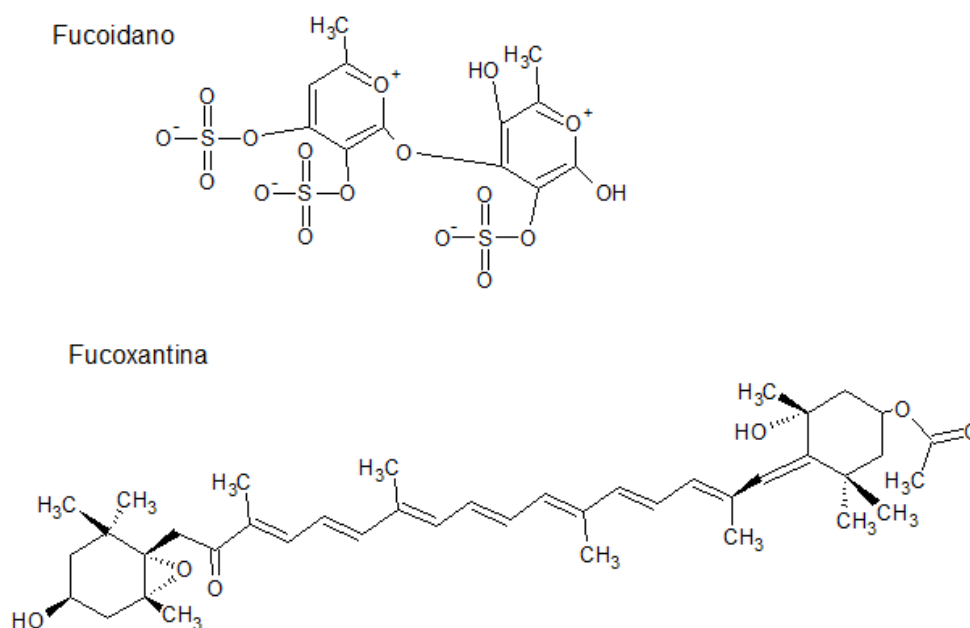


Figura 7 – Estrutura de polissacáridos sulfatados identificados no Fucus, fucoidano e fucoxantina.

Esta alga já foi usada em estudos de inibição da permeação do colesterol na barreira gastrointestinal [44], que demonstraram que na presença de Fucus houve uma diminuição da permeação do colesterol em $45,3 \pm 4,4\%$ [44].

1.4.3. *Eisenia bicyclis*

A *Eisenia bicyclis*, conhecida como Aramé, (Figura 8) é uma alga castanha com cerca de 3-7 anos de vida [171]. O seu ciclo de vida é constituído por esporófitos macroscópicos e gametófitos microscópicos [172]. Estes esporófitos podem crescer até 1 cm de comprimento [173], formando uma densa população denominada “floresta marinha”



Figura 8 - *Eisenia bicyclis*, conhecida como Aramé, [107].

[174]. Esta alga é conhecida por exibir atividade antioxidantes, anti-hipertensivas, antialérgicas e antitumorais [175].

A Aramé tem sido investigada pelos seus compostos bioativos com benefício para a saúde humana. Dentro destes compostos estão incluídos os florotaninos (Figura 9), flavonóides [176], esteróis [177] e polissacáridos, tais como os fucoidanos, e o ácido algínico que apresentam atividades como anti-inflamatória, inibição da hialuronidase, antioxidante e antidiabética [178, 179, 180].

Os dois tipos de compostos fenólicos que foram identificados nesta alga são os florotaninos e os flavonóides. Os florotaninos, foram reportados como apresentando diversas atividades, nomeadamente antidiabética (dieckol e eckol) [181, 182]; antioxidante (eckol) [183]; inibição de metaloproteinases da matriz (MMP) [184]; inibição da hialuronidase (eckol, fucofuroeckol-A, dieckol). Os estudos efetuados com os florotaninos desta alga demonstraram que estes poderão ser usados como ingredientes alimentares funcionais ou potenciais nutracêuticos na prevenção da doença de Alzheimer, uma vez que apresentaram atividade inibitória da acetilcolinesterase (AChE) [185]. Os florotaninos dieckol e eckol provaram reduzir os triglicéridos no soro de rato, e, portanto, com possíveis efeitos na prevenção da hiperlipidemia, nomeadamente da aterosclerose [186]. Os flavonóides, como a epicatequina e o galato de catequina [187], são reportados por apresentarem atividade antioxidante [176, 180].

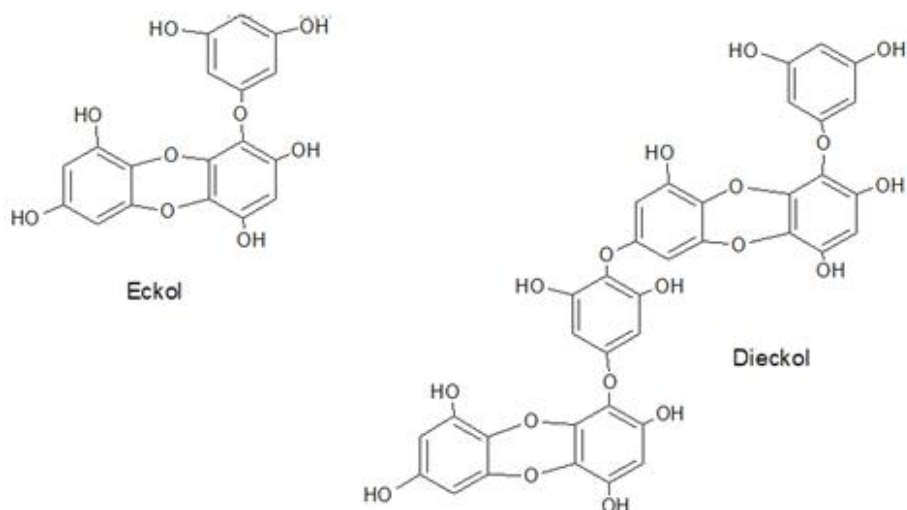


Figura 9 - Estrutura dos compostos fenólicos, eckol e dieckol, identificados na Aramé.

O fucoesterol é um esterol presente nesta alga que apresenta atividade anti-inflamatória [177]. Nos polissacáridos, a fucoxantina também tem atividade biológica pois, inibe a aldose redutase que é uma enzima que está associada à doença de

diabetes, esta propriedade foi reportada para a alga *Ulva fasciata Delile* [188]. Outros polissacáridos identificados nesta alga são a laminarana e o fucoídano, que são polissacáridos sulfatados [189]

Esta alga foi usada para vários estudos, nomeadamente para a inibição da formação de trombos, em ratos, com o objetivo de prevenir as DCV, tendo sido reportado que esta alga tem a capacidade de inibir a formação de trombos [190]; efeito dos florotaninos contra a inflamação induzida por lipopolissacaridos em células HepG2, que demonstrou que esta alga e os seus compostos têm a capacidade de reduzir doenças associadas ao stress oxidativo e a processos inflamatórios; [191] e inibição da proteína tirosina fosfatase 1B (PTB1B) que desempenha um papel fundamental na diabetes *mellitus* tipo 2 e na obesidade [192].

Em todos estes estudos e os demais existentes na literatura para outras algas, constata-se o potencial de muitos dos compostos presentes nas algas poderem ser utilizados como ingredientes bioativos em nutracêuticos ou alimentos funcionais. No entanto, torna-se evidente a necessidade de aprofundar algum deste conhecimento com mais evidências sobre os mecanismos de atuação, não só para comprovar os benefícios para a saúde humana e as atividades biológicas dos compostos bioativos, bem como para avaliar potenciais efeitos adversos e/ou de interação com outros alvos biológicos. [85].

1.5. Atividades biológicas de compostos bioativos

1.5.1 Atividade antioxidante

Os antioxidantes são agentes que reduzem o stress oxidativo causado por espécies reativas [193], geralmente espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS) que resultam do processo celular redox endógeno ou são obtidas por exposição a fontes exógenas de oxidantes [194].

As espécies reativas que resultam do processo celular redox desempenham um papel tanto de compostos tóxicos como de compostos benéficos [195]. Estas espécies, de modo adverso são, moléculas altamente instáveis que danificam macromoléculas como lípidos, proteínas e DNA, levando a danos celulares e em alguns casos morte celular [196], e os seus efeitos negativos estão frequentemente associados a várias patologias, nomeadamente, doenças cardiovasculares [197], vários tipos de cancro [198], envelhecimento [199], doenças respiratórias, como a asma [200], doenças neurodegenerativas como Alzheimer [201], Parkinson [202] e esclerose múltipla [203], cataratas [204], artrite reumatóide [205], arteriosclerose [206] e diabetes *mellitus* tipo 2

[207]. Em relação aos efeitos benéficos, estes compostos quando em baixas concentrações têm efeitos positivos nas respostas celulares e na função imunológica [195].

Os radicais livres que contêm oxigênio, mais importantes em muitas doenças, são o hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), o superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), o dióxido de azoto ($\text{NO}_2\cdot$), o peroxil ($\text{ROO}\cdot$) e o peroxil lipídico ($\text{LOO}\cdot$); na forma não radicalar são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ozono (O_3), oxigênio simples ($1/2 \text{O}_2$), ácido hipocloroso (HOCl), ácido nitroso (HNO_2), peroxinitrito ($\text{ONOO}\cdot$), trióxido de diazoto (N_2O_3) e peróxido lipídico (LOOH).

No organismo, as células são capazes de apresentar atividade celular antioxidante eliminando estas espécies reativas através de agentes antioxidantes, compostos, como vitaminas e o glutathione, e enzimas antioxidantes, nomeadamente, a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPX) [208, 209], mas uma mudança no balanço entre oxidantes e antioxidantes, a favor dos oxidantes é designada stress oxidativo, que contribui para as situações patológicas referidas [194].

Dada a importância dos antioxidantes na saúde humana, nos últimos anos a sua popularidade e procura aumentou, sendo que é comum serem reportados agentes antioxidantes naturais em alimentos, como por exemplo, fruta, vegetais e especiarias [210] e, conseqüentemente, se ter estimulado a incorporação na dieta destes alimentos ricos em antioxidantes. Vários estudos têm reportado que também compostos bioativos de algas, tais como ficobiliproteínas, compostos fenólicos e polissacáridos, apresentam capacidade de neutralizar radicais livres e outras espécies reativas exibindo propriedades antioxidante [188, 48].

1.5.2. Inibição da Acetilcolinesterase

Como referido anteriormente, os florotaninos, eckol e dieckol, identificados na Aramé, demonstraram o potencial de inibir o enzima AChE (E.C. 3.1.1.7) [211]. Este enzima faz parte da família de enzimas colinesterases que catalisam a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético [212], terminando o impulso nervoso na fenda sináptica [213]. Localiza-se nas sinapses colinérgicas entre os neurónios, estas estão localizadas no sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), e nas junções neuromusculares. O AChE encontra-se mais abundantemente no sistema nervoso central, nos músculos esqueléticos e na membrana dos eritrócitos [214].

Na fenda sináptica (figura 10), o neurotransmissor ACh, é sintetizado no neurónio pré-sináptico, a partir da colina e acetilcoenzima A, sob catálise da colina acetiltransferase. Após a sua formação, o ACh é armazenado em vesículas e quando há um estímulo é secretado na fenda sináptica ativando o neurónio pós-sináptico. Depois da ativação, o ACh é hidrolisado pelo AChE em ácido acético e colina que retornam ao neurónio pré-sináptico [215]. Na figura 10, encontra-se uma representação dos acontecimentos na fenda sináptica na presença de um inibidor do enzima AChE (IACHe). Neste caso, o ACh permanece na fenda sináptica prolongando o seu efeito e, conseqüentemente, intensifica a transmissão colinérgica. A inibição reversível da atividade do AChE é usada para acelerar o trânsito gastrointestinal na obstipação severa [216] e na abordagem sintomática no tratamento da demência em doentes com Alzheimer, uma vez que estes apresentam níveis reduzidos de ACh no cérebro [217, 218]. O AChE é uma hidrolase de serina com uma tríade catalítica (Ser, His e Glu) [219]. A sua inibição diminui a taxa de hidrólise da ACh, mantendo os seus níveis na fenda sináptica, o que melhora a memória e a função cognitiva nos doentes de Alzheimer [217, 218].

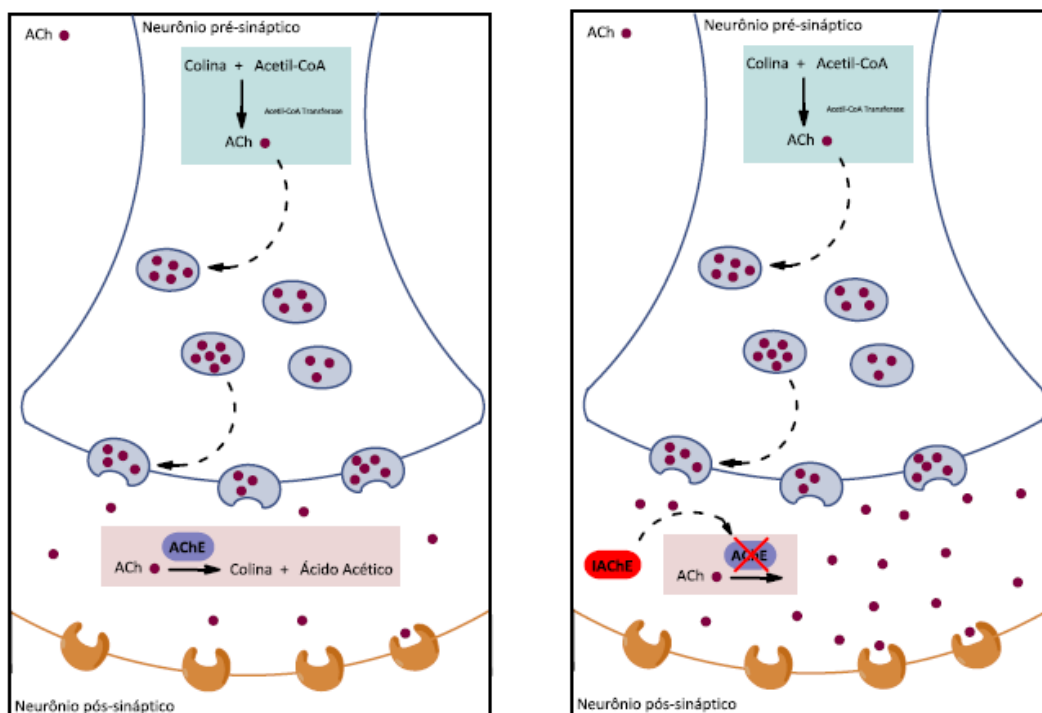


Figura 10 – Representação da quantidade do neurotransmissor ACh, nas sinapses colinérgicas, na ausência e presença de IACHe [220].

A doença de Alzheimer é uma doença neurodegenerativa multifactorial, que como muitas condições degenerativas é associada também ao stress oxidativo [221]. Há

assim um elevado interesse em compostos antioxidantes que possam ter variados alvos biológicos, nomeadamente, os associados a doenças deste tipo e para as quais ainda não há tratamento efetivo.

1.5.3. Análise metabolómica - Efeitos celulares dos compostos bioativos

Os inúmeros efeitos benéficos para a saúde já referidos e a amplitude de atividades biológicas que têm sido reportadas para a diversidade de compostos bioativos presentes em algumas algas comestíveis, alguns já identificados, outros por identificar, coloca a hipótese de múltiplos mecanismos de ação sobre variados alvos biológicos da maquinaria celular, mas que pouco tem sido investigado para o caso das algas.

O desenvolvimento das novas tecnologias ómicas (genómica, proteómica, transcriptómica e metabolómica) tem permitido obter informação relativa a acontecimentos moleculares que ocorrem em sistemas biológicos, abordando grandes conjuntos dos seus genes, transcritos, proteínas e metabolitos [222, 223].

No caso da metabolómica, esta avalia todas as respostas metabólicas celulares a estímulos ambientais, mudanças ou modificações por substâncias exógenas, como alterações celulares provocadas por interação com compostos bioativos, e pode detetar a mudança dinâmica dessa resposta [224], isto é, estuda a composição de metabolitos celulares em amostras biológicas (células, tecidos ou fluidos biológicos) [225, 226].

A metabolómica é aplicada em doenças humanas com novas descobertas que ajudam na compreensão da resistência à insulina e diabetes [227, 228], doença crónica no rim [229], depressão [230] e, nomeadamente em conjunto com diagnóstico de imagem para estudar vários estados da doença de envelhecimento cardiovascular [231, 232].

Os metabolitos são produtos intermediários ou finais de múltiplas reações enzimáticas e, portanto, são as moléculas mais informativas da atividade bioquímica de um organismo [225, 233]. Estes incluem aminoácidos, nucleosídeos, ácidos gordos [234, 235]. O conjunto de metabolitos de baixa massa molecular (1500 Da) presentes num sistema biológico é denominado metaboloma. O metaboloma de uma amostra biológica pode ser alterado como resultado da influência dos referidos estímulos ambientais, mudanças ou por substâncias exógenas [235, 236]. A comparação do metaboloma de uma linha celular sujeita à referida interação com um controlo negativo

sem interação, pode fornecer informações importantes em relação aos alvos celulares e às vias metabólicas afetadas na linha celular devido ao estímulo [237].

Deste modo, a abordagem da metabolômica é detetar metabolitos [238] que, em conjunto com técnicas de análise avançada, programas computacionais e métodos estatísticos e, pela análise da variação na composição e concentração de diversos metabolitos das linhas celulares, permitem inferir vias metabólicas e alvos celulares afetados pelo estímulo e compreender melhor os fenómenos de mudanças metabólicas [232].

Para a análise metabolômica de linhas celulares é preciso extrair os metabolitos das células que estão em contacto com o estímulo e depois analisar e comparar estatisticamente com as células controlo negativo. A análise é feita recorrendo a ferramentas como a ressonância magnética nuclear (NMR) [239] e a espectrometria de massa (MS) [240], que permitem identificar e quantificar os metabolitos presentes. Estas são as técnicas mais usadas neste tipo de estudo, mas também se pode utilizar, menos frequentemente, a espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) [241].

Este trabalho tem por objetivo principal o estudo do efeito benéfico dos extratos das algas Nori, Fucus e Aramé contra a hipercolesterolemia e, em particular o mecanismo de ação sobre as proteínas associadas ao metabolismo do colesterol. No entanto, tendo em conta que os extratos poderão ser utilizados na alimentação foi efetuada uma análise metabolômica nas células do fígado e do intestino para avaliar potenciais alvos celulares que poderão justificar os efeitos benéficos na saúde e atividades biológicas exibidas pelos extratos.

2. Objetivo

Este trabalho tem por base o estudo do potencial terapêutico dos extratos aquosos de algas marinhas comestíveis, nomeadamente *Eisenia bicyclis*, *Porphyra spp* e *Fucus vesiculosus* vulgarmente designados por Aramé, Nori e Fucus, no controle da hipercolesterolemia, um dos principais fatores associado às doenças cardiovasculares.

Para este estudo consideraram-se três objetivos principais:

- Caracterizar os extratos das algas relativamente à sua composição e bioatividades, em particular a atividade antioxidante e a capacidade de inibição de enzimas que são alvos terapêuticos de doenças;
- Investigar a influência dos extratos sobre linhas celulares humanas do fígado e do intestino, nomeadamente avaliar a sua citotoxicidade e entender os seus efeitos sobre o metaboloma e vias metabólicas destas células;
- Avaliar a capacidade de os extratos reduzirem a permeação do colesterol na barreira gastrointestinal e, em particular, avaliar o seu efeito sobre as proteínas transportadoras associadas ao metabolismo do colesterol, que são alvos terapêuticos da hipercolesterolemia.

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes

Para o crescimento de células do adenocarcinoma colorretal (Caco-2) utilizou-se o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640) e para as células do carcinoma hepatocelular utilizou-se o meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), ambos comprados na Biowhittaker® Lonza. O soro de bovino fetal inativado (FBS) foi adquirido da Biowest, a glutamina da Biowhittaker® Lonza e uma solução de antibiótico e antimicótico (100x com 10 000 U/mL de penicilina, 10 mg/mL estreptomicina e 25 µg/mL de anfotericina B) adquirida Sigma®. *Phosphate buffered saline* (PBS) adquirido da Corning e tripsina adquirida da Biowhittaker® Lonza.

Para os ensaios de purificação por SPEs ou extração de mucilagens utilizou-se os reagentes metanol e etanol comprados na Honeywell, Riedel-de-Haën e a água LC-MS comprada Lichrosolv EMD Millipore Corporation.

Para os ensaios de quantificação usou-se o carbonato de cálcio e o ácido sulfúrico concentrado obtido da Merck, o reagente de Folin & Ciocalteu e acetato de sódio adquiridos da Sigma® Aldrich, o floroglucinol comprado na Aldrich® chemistry, o ácido poligalactorónico na Alfa Aesar, o fenol adquirido da VWR e o ácido cítrico na Riedel-de Haën. Para a quantificação de proteínas recorreu-se ao kit 2-D Quant Kit obtido da GE Healthcare.

Para os ensaios da determinação de atividade biológica utilizou-se o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) da Sigma® Aldrich, o tris(hidroximetil)-aminometano (tampão tris) da Merck, o cloreto de sódio da Panreac, o cloreto de magnésio-6-hidratado da Riedel-deHaën, o ácido 5,5'-Ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB) da Alfa Aesar. Nos ensaios de atividade enzimática usou-se a AChE (149 U/mg sólido, 241 U/mg proteína) e a acetilcolina iodada e o kit da HMGR da Sigma® Aldrich.

Nos ensaios em linhas celulares de Caco-2 e Hep-G2 utilizou-se o o brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-1-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) obtido da VWR Life Science para os ensaios de citotoxicidade. Na *transwell* utilizou-se o colesterol adquirido da Sigma® Aldrich. No método de Bradford utilizou-se a albumina de soro bovino (BSA) e o reagente de *Bradford* comprados na VWR Life Science. Para a eletroforese utilizou-se a Acrilamida:Bisacrilamida 29:1 (40%), a glicina e o ácido acético glacial adquiridos da Fisher Scientific™, o persulfato de amónio (PSA) obtido da Sigma®, o N, N, N'N – tetrametiletilenodiamina (TEMED) e o tampão de aplicação adquirido da nzytech, o

Comassie® *Brilliant blue* R-250 comprado na VWR Life Science, o SDS obtido da Panreac e o marcador *PageRuler Prestained Protein Ladder* obtido da thermo scientific. Para o *Western Blotting* utilizou-se a solução de bloqueio comprados na Cytiva Amersham™, os reagentes de detecção adquiridos da GE Healthcare Amersham™, o reagente de Ponceau S obtido da VWR Life Science, o tween® 20 comprado na Amresco®, o anticorpo primário da NPC1L1 (MM = 140 kDa) (NB400-127) e o anticorpo primário do transportador ABCG5 (MM = 73 kDa) (NBP1-95209) obtidos da Novus Biologicals e o anticorpo secundário Anti-Coelho IgG adquirido da Cytiva Amersham™.

3.2. Preparação dos extratos

A alga *Fucus vesiculosus* foi recolhida do Rio Tejo (Latitude 38 7822 N, Longitude 0 0913 E), lavada, cortada em fragmentos e liofilizada. Só após este pré-tratamento é que foi preparada para os ensaios. A *Eisenia bicyclis* foi adquirida da marca Seara (L# T20220405). A *Porphyra* sp. foi adquirida da Blue Dragon (L# JS2039J01).

A proporção de preparação de cada extrato, em água destilada, foi diferente para cada espécie de alga marinha comestível e, de acordo com a disponibilidade. Para o *Fucus vesiculosus* utilizou-se uma proporção de 10 % (m/V), para a *Eisenia bicyclis* uma proporção de 2 % (m/V) e para a *Porphyra* sp uma proporção de 3,3 % (m/V). Após a preparação foi colocado no autoclave, a 121°C durante 15 minutos, após o arrefecimento foi filtrado em papel Whatman nº 1 para obter os extratos. Os filtrados foram congelados a -20°C, liofilizados (HETO PowerDry LL 3000) até à secura e reservados a -20°C. A massa seca dos extratos foi identificada em cada caso como **Fucus**, **Aramé** e **Nori**. Para o cálculo do rendimento obtido para a decocção utilizou-se a seguinte expressão:

$$\eta = \frac{massa_{obtida}}{massa_{utilizada}} \times 100$$

3.3. Método de purificação de extratos de algas - Extração de fase sólida (SPE)

Foram utilizadas as colunas C18 – Sep-Pak C18 Plus Cartucho curto (360 mg de adsorvente por cartucho, tamanho de partícula de 55-105 µm, 50/pk (Waters) - previamente equilibradas e adsorvem compostos hidrófobos.

A coluna foi equilibrada com 1 mL de metanol e 1mL de água *milli-Q*, 1 mL de solução de Fucus (11,77 mg massa seca/mL de água) foi aplicada na coluna, foi recolhida uma solução identificada como **Fucus H₂O** com 3 mL de água *milli-Q*, e de seguida uma

solução identificada como **Fucus MeOH** foi recolhida com 5 mL de metanol. O procedimento foi repetido do mesmo modo até um máximo de 10 mL de solução de Fucus. A solução **Fucus H₂O** foi congelada e seca no liofilizador e a solução **Fucus MeOH** evaporada à secura com ar comprimido.

O mesmo procedimento foi usado para uma solução de 30 mg massa seca/mL água de extrato de Aramé obtendo-se a solução seca **Aramé H₂O** e **Aramé MeOH**; e para uma solução de 15 mg massa seca/mL água de extrato de Nori obtendo-se a solução seca **Nori H₂O** e **Nori MeOH**.

O rendimento foi calculado através da mesma equação usada para determinar o rendimento da decocção.

3.4. Ensaios de Quantificação de compostos nos extratos

3.4.1. Método de Folin-Ciocalteu – Quantificação de fenóis totais

A quantificação dos fenóis totais foi feita de acordo com o método de Folin-Ciocalteu [40] e usando uma reta de calibração (anexo 1.1) construída usando floroglucinol como padrão. Utilizaram-se concentrações de 0-5 mg/mL de floroglucinol para a realização da reta de calibração. A 30 µL da solução padrão adicionou-se 1350 µL de água destilada e 30 µL do reagente Folin-Ciocalteu, agitou-se a solução no vórtex (Heidolph Reax 2000), esperou-se 3 minutos e, por fim adicionou-se 90 µL de uma solução de Na₂CO₃ a 2% (m/v). A solução foi agitada (agitador orbital Stuart Rotator SB2) a 4°C durante 1 hora e registou-se a absorvência a 760 nm (espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV-VIS 160^a). O ensaio foi efetuado em triplicado.

Para a quantificação de fenóis totais preparou-se uma solução aquosa a partir da massa seca da amostra a analisar e utilizou-se na vez de solução padrão. O conteúdo em fenóis totais foi expresso em mg de equivalentes de Floroglucinol por mg de massa seca (PGE/mg massa seca).

3.4.2. Quantificação de proteínas nos extratos de algas e células

Para a quantificação de proteínas nos extratos Aramé, Nori e Fucus e respetivas frações purificadas recorreu-se ao kit 2-D Quant Kit da GE Healthcare e neste seguiu-se o procedimento standard fornecido pela empresa. O ensaio foi efetuado em triplicado.

Para a análise por *Western Blotting*, a quantificação de proteína nas amostras a analisar foi feita pelo método de Bradford, seguindo-se o procedimento descrito em

[242], e utilizou-se soluções de BSA de diferentes concentrações para obter a curva de calibração. Os ensaios foram efetuados em triplicado.

3.4.3. Método do Fenol-Ácido Sulfúrico – Quantificação de polissacáridos

A quantificação dos polissacáridos foi feita de acordo com o método do Fenol-ácido Sulfúrico [243] e usando uma reta de calibração (anexo 1.2) usando o ácido poligalacturónico como padrão. Utilizaram-se concentrações entre 0-10 mg/mL. O ácido poligalacturónico foi dissolvido num tampão citrato 0,05 M e pH=4,5 (pH da HANNA® Edge^{pH}). Num eppendorf adicionou-se 50 µL solução padrão, 150 µL de H₂SO₄ concentrado e 30 µL de uma solução aquosa de fenol 5% (m/v). Incubou-se a mistura reacional num banho termostático (LAUDA Ecoline Staredition RE 104) a 90°C durante 5 minutos. Após o arrefecimento até à temperatura ambiente leu-se a absorvência a 490 nm num leitor de microplacas (TECAN® Sunrise). O ensaio foi efetuado em triplicado.

Para a quantificação de polissacáridos preparou-se uma solução aquosa a partir da massa seca da amostra a analisar e utilizou-se na vez de solução padrão. O conteúdo em polissacáridos foi expresso em mg de equivalentes de ácido poligalacturónico por mg de massa seca (PE/mg massa seca).

3.5. **Análise por High-performance liquid chromatography with diode array (HPLC-DAD) dos extratos**

Para a análise por HPLC-DAD (VWR HITACHI, com um detetor L-2455, forno da coluna L-2300, autosampler L-2200 e a bomba L-2130) foi utilizada uma coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-18 (5 µm) e uma fase móvel constituída por um sistema binário de ácido trifluoracético (0,05 %) (TFA) e acetonitrilo (ACN) a um fluxo de 0,8 mL/min. O volume de injeção foi de 25 µL de amostra com eluição em modo gradiente, do seguinte modo: 0 min 0 % ACN e 100 % TFA; 30 min 30 % ACN e 70 % TFA; 40 min 80 % ACN e 20 % TFA; 45 min 80 % ACN e 20 % TFA; 50 min 30 % ACN e 70 %. A deteção foi feita entre os 200 e os 500 nm.

3.6. **Determinação de Atividades biológicas dos extratos**

3.6.1. Atividade Antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante utilizou-se o método do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH). O radical DPPH devido à deslocalização de eletrões apresenta cor púrpura que absorve a 517 nm, quando sofre redução na presença de agentes antioxidantes, forma difenil-picril-hidrazina de coloração amarela [243]. A 1 mL de solução de DPPH 0,002 % (m/V) de DPPH em metanol adicionou-se 25 µL de uma solução aquosa da amostra a analisar, incuba-se 30 minutos ao abrigo da luz solar e

registra-se a absorvência a 517 nm. De modo semelhante, registou-se a absorvência a 517 nm de um ensaio controlo (100 % atividade antioxidante) em que foi usada água na vez da solução a quantificar. A percentagem de atividade antioxidante (AA) foi determinada a partir da seguinte expressão:

$$AA(\%) = \frac{100 \times (A_{DPPH} - A_{amostra})}{A_{DPPH}}$$

na qual, A_{DPPH} corresponde à absorvência do controlo e a $A_{amostra}$ corresponde à absorvência da amostra. Os ensaios foram efetuados em triplicado.

A determinação das atividades antioxidantes para soluções aquosas de amostra em diferentes concentrações permitiu calcular a EC_{50} , a concentração efetiva da amostra que apresenta 50 % de atividade antioxidante.

3.6.2. Atividade de inibição da Acetilcolinesterase

Para a determinação da atividade inibitória do enzima acetilcolinesterase, seguiu-se o procedimento descrito em [244]. Começou-se por determinar a atividade enzimática do controlo, isto é, sem qualquer tipo de inibidor, que corresponde à atividade máxima do enzima. Nesta fase do ensaio, adicionou-se 325 μ L de tampão Tris 50 mM, pH 8, 100 μ L de água *Milli-Q* e 25 μ L da solução de enzima (0,1 UA/min). Incubou-se durante 15 minutos à temperatura ambiente, de seguida adicionou-se 75 μ L de uma solução de acetilcolina (AChI) e 475 μ L de DTNB (1,2 mg/mL em tampão Tris com sais (0,1 M NaCl e 0,02 M $MgCl_2$)). Leu-se a absorvência a 405 nm (espectrofotómetro UV-VIS Shimadzu UV-VIS 160^a) durante cerca de 3 minutos, contra o branco. O mesmo procedimento foi realizado para as diferentes amostras, usando a solução da amostra na vez da água *Milli-Q*. Os ensaios foram efetuados em triplicado.

A percentagem de inibição da atividade do AChE na presença de cada amostra, calcula-se recorrendo à seguinte equação:

$$I (\%) = 100 - \left(\frac{v_{amostra}}{v_{controlo}} \right) \times 100$$

na qual I (%) corresponde à percentagem de inibição da AChE na presença da amostra a analisar, $v_{amostra}$ corresponde à velocidade inicial da reação contendo o inibidor e $v_{controlo}$ corresponde à velocidade inicial da reação sem inibidor.

A determinação das atividades de inibição da AChE para soluções aquosas das amostras a analisar de diferentes concentrações permitiu calcular a EC_{50} , a concentração efetiva que apresenta 50 % de atividade de inibição da AChE.

3.6.3. Inibição da HMGR

Para a determinação da inibição da HMGR, seguiu-se o procedimento fornecido pelo kit. Para determinar os 100 % de atividade inibitória de HMGR, leu-se a absorvência a 340 nm em função do tempo, de uma solução de tampão + NADPH + HMG +HMGR, para determinar o consumo do co - substrato. Para a determinação da atividade inibitória do HMGR, efetuou-se uma solução igual à anterior, mas com a presença dos extratos (inibidores). Foi também realizado um ensaio com um fármaco, a pravastatina (inibidor). Os ensaios foram efetuados em triplicado.

3.7. Cultura das linhas celulares

A linha celular do adenocarcinoma hepático (Hep-G2, ECACC 85011430), foi cultivada em meio DMEM, suplementado com 10 % de FBS, 2 mM de L-glutamina e 1 % de uma solução de antimicótico e antibiótico. Foi incubada a 37°C numa estufa (Sanyo O₂/CO₂ Incubator) com 5 % de CO₂. O As células foram cultivadas tanto em frascos T25 (25 cm²) como em frascos T75 (75 cm²). O meio foi trocado a cada 48 ou 72 horas.

As Hep-G2 são células derivadas do carcinoma hepatocelular do fígado humano, que crescem de modo aderente e, portanto, representam o comportamento do fígado [245]. Expressam várias proteínas transportadoras de colesterol, nomeadamente a NPC1L1 [19], ABCG5/ABCG8 [246] e ABCA1[247].

A outra linha celular utilizada foi a do adenocarcinoma colorretal (Caco-2, ECACC 86010202), que foi também incubada a 37°C numa estufa (Sanyo O₂/CO₂ Incubator) com 5 % de CO₂. O meio de cultivo foi o RPMI -1640, suplementado com 20 % de FBS, 2 mM de L-glutamina e 1 % de uma solução de antimicótico e antibiótico. Esta linha celular também foi cultivada tanto em T25 como em frascos T75.

As Caco-2 são células derivadas do adenocarcinoma colorretal humano, são recomendadas pela FDA para avaliar a permeação de medicamentos [248]. Crescem de forma aderente e desenvolvem metabolismo semelhante às células presentes no intestino delgado, por isso representam o comportamento do intestino na absorção de colesterol [249]. Expressam várias proteínas transportadoras de colesterol, nomeadamente a NPC1L1, ABCG5/ABCG8 [250].

Quando as células atingiram, aproximadamente, 80% de confluência foram tripsinizadas. A tripsinização consiste na remoção do meio de cultura e lavagem das células com 1 mL de PBS, de forma a remover todos os resíduos de meio. Após a lavagem adicionou-se 1 mL de tripsina 1x e deixou-se incubar a 37°C, durante

aproximadamente 5 minutos. As células foram depois ressuspensas em meio de cultura fresco para aderirem novamente.

3.7.1 Ensaio da citotoxicidade (MTT)

Para o ensaio do MTT seguiu-se o procedimento descrito em [243]. Primeiramente, as células tripsinizadas de um T75 foram cultivadas numa microplaca de 96 poços, tanto para a linha celular Caco-2 como para a linha celular Hep-G2. As microplacas foram incubadas durante 48 horas, a 37°C a uma atmosfera de 5% de CO₂. Prepararam-se soluções, em meio de cultura, com concentração de 1 mg/mL e 0,5 mg/mL de massa seca dos extratos de Nori, Fucus e Aramé. Estas soluções foram aplicadas nos respetivos poços, 100 µL em cada poço. Incubou-se a microplaca durante 24 horas.

Preparou-se a solução de MTT, com concentração de 0,5 mg/mL. Retirou-se o meio da microplaca e lavou-se os poços com PBS. Adicionou-se 100 µL da solução de MTT a todos os poços. Incubou-se durante 4 horas. Ao fim destas 4 horas, observou-se ao microscópico ótico invertido (Motic AE21 type 101M) a formação de cristais.

Retirou-se a solução de MTT nos poços e, numa primeira fase, adicionou-se 100 µL de metanol. De forma a tentar dissolver os cristais, com uma micropipeta aspirou-se a solução e voltou a colocar-se no respetivo poço. Depois adicionou-se mais 100 µL de metanol. Por fim, leu-se a absorvência a 595 nm, com a referência a 630 nm.

Para calcular a percentagem de viabilidade celular utilizou-se a seguinte equação:

$$V.C. (\%) = \left(\frac{Abs_{amostra}}{Abs_{controlo}} \right) \times 100$$

Onde V.C. (%) é a percentagem de viabilidade celular, Abs_{amostra} é a absorvência obtida para as células que estiveram em contacto com o extrato e Abs_{controlo} é a absorvência obtida para as células controlo. A partir da equação anterior é possível calcular a percentagem de citotoxicidade (C (%)).

$$C (\%) = 100 - V.C. (\%)$$

3.7.2. Análise da permeação do colesterol em modelo da barreira gastrointestinal

As células Caco-2 simulam a barreira gastrointestinal. Para simular essa barreira efetuou-se o ensaio da *transwell* que consiste numa microplaca de 12 poços com os *inserts* (Falcon® com áreas de 0,9 cm²) da *transwell* cultivados com células Caco-2.

Neste ensaio, utilizou-se a concentração celular de 5×10^4 cel/mL, como descrito em [40], e a contagem celular foi efetuada pela câmara de Neubauer improved (Marienfeld) e para a visualização das células utilizou-se o microscópio ótico invertido (Motic AE21 type 101M).

As monocamadas foram formadas até atingirem confluência e então diferenciadas (cerca de 23 dias). O meio foi substituído a cada 48 horas. A integridade da monocamada foi avaliada medindo a resistência elétrica celular com um medidor Millicell ERS-2 V Ohm (Millipore). As monocamadas foram consideradas aptas aos estudos de permeabilidade ao apresentarem uma resistência elétrica igual ou superior a $200 \Omega/\text{cm}^2$. Na câmara de fluxo laminar (Esco® Class II Biohazard safety cabinet), as células foram lavadas com Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). Após 6 horas de incubação das amostras a analisar, a 37°C em atmosfera contendo 5 % de CO_2 , as soluções apicais e basolaterais foram recolhidas e alíquotas de $75 \mu\text{L}$ foram analisadas no RP HPLC-DAD.

Para a quantificação da permeação do colesterol, foi utilizada uma coluna LiChroCART® 250-4 LiChrospher® 100 RP-8 ($5 \mu\text{m}$) e uma fase móvel constituída por um sistema binário de MeOH e acetonitrilo (ACN) a um fluxo de 1 mL/min. O volume de injeção foi de $75 \mu\text{L}$ de amostra. As condições de eluição são: 0 min 50% MeOH 50% ACN; 15 min 50% MeOH 50% ACN. Para a análise da permeação das algas, utilizou-se a coluna e o método referidos no ponto 3.6

Para a determinação da permeação do colesterol utilizou-se a altura do pico a 210 nm entre 4,5-5,5 minutos, sendo que o controlo negativo (5 mM de colesterol dissolvido em etanol) correspondia a 100 % de permeação, deste modo, utilizou-se a seguinte expressão:

$$\% \text{ Permeação de colesterol} = \frac{\text{Altura pico} \times 100}{\text{Altura pico}_{\text{controlo negativo}}}$$

A partir da expressão anterior é possível determinar a redução da percentagem de permeação do colesterol:

$$\% \text{ Redução permeação de colesterol} = 100 - \% \text{ Permeação de colesterol}$$

Para a determinação da permeação dos compostos bioativos, presentes nos extratos de massa seca de Nori, Fucus e Aramé, utilizou-se o pico com o máximo entre 250 e 500 nm, nos 7 – 9 minutos, que corresponde a 100 % de permeação dos compostos bioativos, sendo assim o controlo. Desta forma, recorreu-se à seguinte expressão:

$$\% \text{ Permeação compostos bioativos} = \frac{\text{Altura pico} \times 100}{\text{Altura pico}_{\text{controlo}}}$$

3.7.3. Extração de metabolitos e proteínas

Neste ensaio começou-se por cultivar as células em frascos T25, no caso das Hep-G2, deixou-se que atingissem a confluência e, no caso das Caco-2, após atingirem a confluência as células foram diferenciadas por 10 dias, para introduzir o extrato da alga.

Após a incubação, para cada linha celular, foram usadas duas condições: um ensaio controlo e um ensaio com a amostra a analisar. No ensaio controlo, removeu-se o meio de cultura do T25, lavou-se as células com PBS e introduziu-se 7 mL de meio de cultura fresco. Para o outro ensaio, no T25 removeu-se o meio de cultura, lavou-se as células com PBS e colocou-se 7 mL do meio de cultivo suplementado com 0,3 mg de massa seca/mL do extrato de algas. Os frascos foram incubados durante 24 horas, removeu-se o meio, as células foram lavadas duas vezes com PBS arrefecido e congeladas a -80°C até à extração de proteínas ou metabolitos.

Para o ensaio de extração de metabolitos e proteínas seguiu-se o procedimento descrito em [244]. A fração das proteínas foi quantificada pelo método de Bradford e usada para as análises por SDS-PAGE e *Western Blotting*.

3.8. **Análise do proteoma das suspensões celulares**

3.8.1. Eletroforese SDS-PAGE das proteínas removidas das células Caco-2 e Hep-G2 após o contacto com os extratos de algas

Após a quantificação de proteínas no *pellet* obtido através da extração de metabolitos e proteínas, dissolveu-se as proteínas no tampão de corrida (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M, SDS 0,1 % (p/V), pH 8,3). Para a eletroforese utilizou-se um gel SDS-PAGE tris-bisacrilamida, onde o gel de concentração é de 4% e o gel de resolução é de 10 %. Adicionou-se a 30 µL de amostra, 7,5 µL de tampão de aplicação, levou-se ao banho de ultrassom durante 5 minutos e centrifugou-se durante 5 minutos a 12000 g. Aplicou-se 15 µL desta solução no poço. Aplicou-se também no gel, 5 µL de marcador. A corrida electroforética foi desenvolvida a 100 V, fornecida pela fonte de alimentação (VWR life Science) e no tanque (Bio-Rad Mini-PROTEAN® 3 Cell), durante cerca de 2 horas.

No fim da corrida, o gel foi corado com o corante azul de Coomassie R-250 durante uma hora. Por fim, a imagem do gel foi obtida no aparelho fotográfico (ImageQuant Las 500) e foi analisada no software *ImageJ*.

Para eliminar os erros de quantificação e aplicação de proteína, isto é, assumir-se que em todos os poços foi aplicada a mesma quantidade de proteína, procedeu-se à normalização das áreas obtidas. Para a normalização utilizou-se a seguinte expressão:

$$\text{Área normalizada} = \frac{\text{área obtida}}{\sum \text{áreas de cada lane}}$$

3.8.2. Western Blotting das proteínas removidas das células Caco-2 e Hep-G2 após o contacto com os extratos de algas

A técnica de *Western Blotting* começou com uma eletroforese SDS-PAGE, então, nesta primeira etapa seguiu-se o procedimento descrito no ponto 3.8.1.

Os géis e a transferência decorreram de acordo com as instruções do fabricante, utilizou-se os papéis de filtro 7 x 8,4 cm da Thermo Fisher Scientific, o módulo mini blot e o tanque da Invitrogen. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários e secundários e a deteção foi efetuada de acordo com as instruções do fornecedor. A aquisição da imagem da membrana foi efetuada no equipamento LAS 500 pelo método quimioluminescente e o software *ImageJ* foi usado no tratamento da imagem.

3.9. Condições analíticas do LC-QTOF-MS

Para a análise por LC-QTOF-MS foi utilizada uma coluna iChrospher® 100 RP-18 (5 µm) LiChroCART® 250-4 mm e uma fase móvel constituída por um sistema binário de 0,1 % de ácido fórmico e de MeOH a um fluxo de 1 mL/minutos. O método utilizado foi seguinte: 0 min 80% ácido fórmico 20% MeOH; 20 min 20% ácido fórmico 80% MeOH; 25 min 20% ácido fórmico 80% MeOH; 30 min 80% ácido fórmico 20% MeOH. Os espetros de massa de alta resolução foram adquiridos através dos modos ESI positivo e negativo.

Os espetros de massa foram adquiridos na gama de 120-1000 m/z e os parâmetros do espectrómetro de massa foram ajustados com vista a otimizar a relação sinal/ruído (S/N) para os iões de interesse. Resumidamente, as taxas de fluxo de nebulização e gás auxiliar (azoto) foram de 40 e 20 unidades arbitrárias, a temperatura capilar foi estabelecida nos 250°C e as energias de colisão de 40 e 45 eV.

A análise estatística foi usada para retirar a informação importante dos dados e, para isso foram aplicados métodos como a análise dos componentes principais (PCA) e o método dos mínimos quadrados parciais (PLS) [251]. A identificação dos metabolitos, apenas para estudos globais, foi realizada recorrendo a bases de dados [252]. Para a análise dos resultados da espetrometria de massa recorreu-se aos softwares desenvolvidos pela Bruker® (Darmstadt, Alemanha) *Metaboscape* e ao *DataAnalysis*.

No estudo das vias metabólicas usando o software *Metaboanalyst* usaram-se os valores de intensidade dos valores m/z que tiveram variação estatística significativa entre o controle e a amostra, apresentando *p-value* < 0,05 e $0,5 < \textit{fold change} > 1,7$ pois, o objetivo foi estudar as vias metabólicas mais afetadas pela presença ou ausência dos extratos das algas em estudo. O *fold change* foi calculado pela seguinte expressão:

$$\textit{Fold Change} = \frac{\textit{Intensidade média}_{\textit{controle}}}{\textit{Intensidade média}_{\textit{alga}}}$$

3.10. Análise Estatística de Resultados

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Microsoft Office Excel, com os resultados expressos em média ± desvio padrão. O tratamento estatístico dos resultados foi efetuado recorrendo à análise de variância “ANOVA de fator único”.

4. Resultados e Discussão

Apesar do progresso na mudança no estilo de vida e terapias farmacológicas na prevenção de DCV, estas são as principais causas de morte em todo o mundo, sendo a hipercolesterolemia um dos fatores de risco. A ingestão de alguns produtos naturais, em combinação com os fármacos anti-hiperlipidémicos, tem sido reportada como uma estratégia para a terapia da hipercolesterolemia. Assim sendo, tem existido um aumento no interesse em algas como produtos naturais comestíveis, devido aos reportados benefícios e propriedades que os seus compostos bioativos apresentam.

Apesar deste aumento no interesse em algas como produtos naturais comestíveis, os benefícios que poderão ter sobre a saúde ainda estão pouco estudados. Então, com o objetivo de estudar do potencial terapêutico dos extratos aquosos de algas marinhas comestíveis, nomeadamente *Eisenia bicyclis*, *Porphyra spp* e *Fucus vesiculosus* vulgarmente designados por Aramé, Nori e Fucus, no controlo da hipercolesterolemia, neste trabalho foi proposto:

- Caracterizar os extratos de algas em fenóis totais, polissacáridos e proteínas bem como as suas atividades biológicas, nomeadamente, atividade antioxidante, atividade inibitória do AChE e atividade inibitória do HMGR;
- Avaliar a capacidade dos extratos em reduzirem a permeação do colesterol na barreira gastrointestinal e avaliar o efeito nas proteínas transportadoras do colesterol;
- Investigar a influência dos extratos sobre o metaboloma de linhas celulares de fígado e intestino.

4.1. Caracterização dos extratos e das frações purificadas

A partir da biomassa das algas obteve-se um extrato dos seus compostos bioativos através de uma decocção (ponto 3.2.) e, posteriormente procedeu-se a uma purificação por extração em fase sólida (SPE), onde se recolheram para cada extrato uma fração em água (H₂O) e uma fração em metanol (MeOH).

Os rendimentos obtidos através da decocção foram de 65 % para o extrato de Aramé, 50 % para o extrato de Nori e 38% para o extrato de Fucus. Para as frações purificadas obteve-se um rendimento de 13 % e 71 % para as frações de Aramé MeOH e Aramé H₂O, respetivamente. No caso da fração Nori MeOH, obteve-se um rendimento de 25 % e para a fração Nori H₂O obteve-se um rendimento de 42 %. Já para as frações de Fucus

obteve-se rendimentos de 18 % e 82 % para as frações Fucus MeOH e Fucus H₂O, respetivamente.

Os rendimentos obtidos após a purificação dos extratos por SPE foram muito baixos, nomeadamente para as frações de metanol. Uma das justificações pode ser o facto de muito extrato ficar retido na resina da coluna uma vez que estas adsorvem maioritariamente compostos hidrofóbicos. Adicionalmente verificou-se que quer o extrato de Nori, quer o de Fucus apresentaram muita resistência ao filtro devido à sua viscosidade. Nota-se também que, a maior parte da massa obtida foi na fração de água o que é expectável, uma vez que, o extrato inicial é uma solução aquosa de algas secas.

Os extratos das algas e as frações purificadas, depois de liofilizados ou secos no ar comprimido, foram analisados quanto à sua composição em fenóis totais, polissacáridos e proteínas. Esta caracterização teve como objetivo avaliar os possíveis compostos presentes nas algas marinhas comestíveis e, ainda comparar os extratos nativos com os purificados para ver quais apresentavam maior potencial para aplicação neste estudo. Além destes ensaios ainda se analisaram os extratos da decocção e os purificados por HPLC-DAD para obter um perfil dos compostos presentes.

A quantificação dos fenóis totais para os diferentes extratos das algas foi feita de acordo com o método de Folin-Ciocalteu. No anexo 1.1. encontra-se a curva de calibração utilizada no cálculo da quantidade de fenóis totais e estão apresentadas as quantidades de fenóis totais em equivalentes de floroglucinol por quantidade de extrato (mg PGE/ mg massa seca).

Ao analisar a figura 38 do anexo 1.1, observou-se que a maior quantidade de fenóis totais foi obtida para o extrato de Aramé, seguindo o extrato de Fucus e, por fim, o extrato de Nori. Em relação às frações de purificação SPE dos extratos, pode observar-se que a Aramé e o Fucus apresentaram fenóis totais tanto na fração de metanol como na fração de água. A Nori apenas apresentou fenóis totais na fração de metanol. Nas frações de metanol de Aramé e Nori que apresentaram maior quantidade de fenóis totais quando comparado com os respetivos extratos, conseguiu-se concentrar um maior conteúdo de compostos fenólicos na fração metanólica. E por fim, no caso do extrato de Fucus, os compostos fenólicos foram maioritariamente obtidos na fração aquosa. Isto sugere que a diferente natureza dos compostos fenólicos presentes nos extratos das diferentes algas, sendo maioritariamente mais hidrofóbicos na Aramé e Nori e menos no Fucus. De acordo com a bibliografia sabe-se que a Aramé tem na sua constituição flavonóides que são compostos hidrofóbicos [187].

Comparando os resultados obtidos em fenóis totais com alguns resultados da literatura, nota-se que para o extrato de Aramé obteve-se $0,063 \pm 0,005$ mg PGE/ mg massa seca, uma maior quantidade que o valor reportado de $0,036 \pm 0,005$ mg PGE/ mg massa seca [253]. Possivelmente devido à origem da alga ser diferente e ao método de extração do extrato de alga [146, 147, 253]. Enquanto, para o extrato de Fucus se obteve $0,015 \pm 0,006$ mg PGE/ mg massa seca um valor semelhante ao reportado na literatura, $0,015 \pm 0,001$ mg PGE/ mg massa seca [44]. E também para o extrato de Nori, em que se obteve um valor de $0,006 \pm 0,008$ mg PGE/ mg massa seca aproximado ao da literatura de $0,0067 \pm 0,0001$ mg PGE/ g massa seca [254].

A quantificação de polissacáridos para os diferentes extratos das algas foi feita de acordo com o método do fenol-ácido sulfúrico. A curva de calibração utilizada na determinação do conteúdo de polissacáridos encontra-se no anexo 1.2 bem como o gráfico com as quantidades de equivalentes de ácido poligalacturônico por quantidade de extrato (mg PE / mg massa seca).

Ao analisar a figura 40 do anexo 1.2, nos extratos das algas, observa-se que a maior quantidade de polissacáridos foi encontrada no extrato de Nori, seguindo-se o extrato de Fucus e, por fim, o extrato de Aramé. Em relação às frações purificadas por SPE dos extratos, observa-se que nas frações de água, a Aramé foi a alga que apresentou maior quantidade de polissacáridos, alguns polissacáridos solúveis em água são comuns nas algas e são maioritariamente polissacáridos sulfatados, no caso das algas castanhas o laminarana e fucoidano são exemplos que já foram identificados nesta alga [189]. Apesar de o Fucus ser uma alga castanha não se verificou o mesmo que na Aramé pois, os fucoicanos são muito diferentes entre espécies de algas e, portanto, neste caso, têm uma natureza diferente [255].

O extrato de Nori e o extrato de Fucus apresentaram praticamente a mesma quantidade de polissacáridos. As frações em metanol de Aramé e Nori apresentaram quantidades elevadas de polissacáridos. A quantidade de polissacáridos na fração purificada em metanol de Nori foi bastante superior ao da fração em água, portanto, a maioria dos polissacáridos presentes nesta fração são de natureza menos polar apresentando menor solubilidade em água, o que poderá explicar a sua viscosidade. Destes polissacáridos os que frequentemente têm sido reportados em algas são a celulose, xilanos e mananos [120].

Para o extrato de Nori, obteve-se $0,583 \pm 0,004$ mg PE/ mg massa seca, o que para uma concentração de 2,5 mg/mL de extrato de Nori corresponde a cerca de 61% de

polissacáridos e segundo a literatura, está reportado um intervalo de valores de 50-76% [256]. Para o extrato de Fucus, obteve-se $0,529 \pm 0,008$ mg PE/ mg massa seca, o que corresponde a cerca de 41% para uma concentração de 5,89 mg/mL de extrato de Fucus, sendo que na literatura está reportado um intervalo de valores superior de 62-66% [256], o que pode estar relacionado com o local de crescimento da alga [146, 147]. Para o extrato de Aramé, obteve-se $0,221 \pm 0,001$ mg PE/ mg massa seca, o que corresponde a cerca de 23%, para uma concentração de 2,5 mg/mL sendo que não foram encontrados valores na literatura para extratos de Aramé. Ainda assim, uma vez que a Aramé é uma alga castanha como o Fucus, o resultado obtido é menor para a Aramé, o que pode ser atribuído a diferenças nas espécies ou a alterações no local de cultivo e recolha da biomassa, uma vez que o mesmo se constatou com a quantificação de fenóis totais [146, 147].

A quantificação de proteínas foi feita de acordo com o kit 2-D Quant Kit da GE Healthcare. Neste ensaio, apenas o extrato de Fucus apresentou proteínas tendo-se obtido um valor de $0,0074 \pm 0,0004$ mg proteínas totais/ mg massa seca.

Apesar das algas marinhas serem consideradas uma fonte rica em proteínas, os seus extratos aquosos não são, o que pode justificar os resultados obtidos é a dificuldade de extração das proteínas da biomassa bruta devido a uma complexa parede celular [257]. Ou também pode estar relacionado com a decocção e liofilização que os extratos sofreram pois, são técnicas que utilizam temperaturas extremas podendo levar à desnaturação das proteínas.

Foi efetuada uma análise por HPLC-DAD dos extratos e das frações purificadas por SPE, com o objetivo de avaliar as diferenças nos compostos presentes nas amostras em cada uma das situações.

Para o extrato de Aramé e para as duas frações de extrato purificadas em água e metanol, os cromatogramas obtidos encontram-se na figura 42 do anexo 1.4.

Analisando os cromatogramas, foi possível observar que os compostos 1, 2, 3, e 7 encontram-se no extrato e em ambas as frações obtidas por purificação com SPE. Através da análise dos cromatogramas, pode-se concluir que, após a purificação por SPE nas frações obtidas de um modo geral ocorreu a diminuição na concentração de muitos compostos, uma vez que a maioria destes não foram obtidos maioritariamente numa das frações.

Exceto no caso do composto 6, que foi fracionado para a fração Aramé H₂O e os compostos 3, 4 e 5 que se encontram maioritariamente na fração Aramé MeOH. No caso destes últimos, dada a sua natureza e uma vez que esta fração demonstrou um elevado conteúdo em fenóis totais (4.1.) poder-se-á assumir que têm a natureza dos compostos fenólicos, nomeadamente florotaninos, derivados do floroglucinol frequentemente encontrados em algas, como o dieckol e eckol [181, 182], referidos no ponto 1.4.3 como estando reportados no extrato de Aramé. A análise do cromatograma do floroglucinol usado como padrão, no anexo 1.5. indica que este foi detetado ao tempo de retenção próximo dos 10 minutos, o que coincide com o tempo de retenção aproximado destes compostos.

Para o extrato de Nori e para as frações purificadas, os cromatogramas obtidos encontram-se na figura 43 do anexo 1.5.

Através da análise dos cromatogramas da figura 12, pode-se concluir que os compostos 1' e 2' estão maioritariamente na fração Nori H₂O e o composto 3', 4' e 5', estão maioritariamente na fração Nori MeOH. Tendo em conta que a fração em metanol do extrato da Nori revelou um pico elevado, segundo a natureza do composto 3' e o seu tempo de retenção, assumiu-se que o composto 3' possivelmente corresponde a um florotanino, derivado de floroglucinol. Neste extrato da Nori também se constatou que, a purificação por SPE levou à diminuição da concentração ou mesmo à perda de alguns compostos.

Para o extrato de Fucus e para as frações de extrato purificado, os cromatogramas obtidos encontram-se na figura 44 do anexo 1.6.

Segundo a análise dos cromatogramas, pode-se concluir que, os compostos 2'', 3'' e 4'' e 7'' estão presentes quer no extrato de Fucus e nos extratos purificados, sendo que o composto 8 não foi recuperado em qualquer das frações. Na fração de Fucus MeOH encontram-se em maior quantidade os compostos 4'', 5'' e 6'' que por estarem a um tempo de retenção aproximado de 10 min poderão ser florotaninos, derivados do floroglucinol. O extrato de Fucus apresentou também compostos de natureza mais hidrofílica, como 1'', 2'' e 3'', como foi referido no ponto 1.4.2, estes compostos podem representar polissacáridos sulfatados fucoïdanos e a fucoxantina [161, 162], mas na fração aquosa Fucus H₂O recolhida deste extrato estes compostos encontraram-se numa quantidade muito reduzida, com elevadas perdas devido à purificação por SPE.

Os cromatogramas dos extratos das algas foram ainda representados a 265 nm para quantificar os derivados do floroglucinol (Figuras 47, 48 e 49 do anexo 1.9). Deste modo,

os picos identificados como 3, 4 e 5 no cromatograma 14; 3' no cromatograma 15 e 4'', 5'' e 6'' no cromatograma 16, respetivamente dos extratos da Aramé, Nori e Fucus assumiram-se como correspondendo a florotaninos, derivados do floroglucinol. Com base nos resultados obtidos foi possível calcular a concentração do floroglucinol nos extratos obtendo-se para o pico mais intenso nos extratos os valores de 0,0046; 0,0156 e 0,0128 mg de floroglucinol/mg de massa seca de extrato, para respetivamente, Aramé, Nori e Fucus.

4.2. Toxicidade e atividades biológicas dos extratos das algas

Uma vez que se identificou na caracterização anterior que os extratos continham uma composição diferente das suas respetivas frações, sendo que para todos os extratos se constatou que ocorreram perdas de compostos durante o fracionamento por SPE, foi importante avaliar a toxicidade e a atividade antioxidante de modo a selecionar quais entre extrato e respetivas frações seriam mais bioativas e não tóxicas para utilização em etapas subsequentes do trabalho.

4.2.1. Análise da citotoxicidade dos extratos e frações em linhas celulares Caco-2 e Hep-G2

De modo a avaliar a citotoxicidade, determinou-se a viabilidade celular das linhas celulares do adenocarcinoma hepático (Hep-G2) e do adenocarcinoma colorretal (Caco-2), quando em contacto com duas concentrações de extratos de Aramé, Nori e Fucus e das respetivas frações purificadas por SPE, por comparação com células controlo no meio de cultura, referenciadas como apresentando 0 % de citotoxicidade. Os dados obtidos para a citotoxicidade celular para as duas concentrações testadas, em células Hep-G2 encontram-se na figura 11, e na figura 12 para as células Caco-2. No anexo 2.1., encontram-se as tabelas com os valores de citotoxicidade obtidos. Para o extrato de Fucus, apenas foi testado o extrato nativo dada a limitação de amostra e porque nos ensaios anteriores as frações apresentaram sempre baixo conteúdo em compostos.

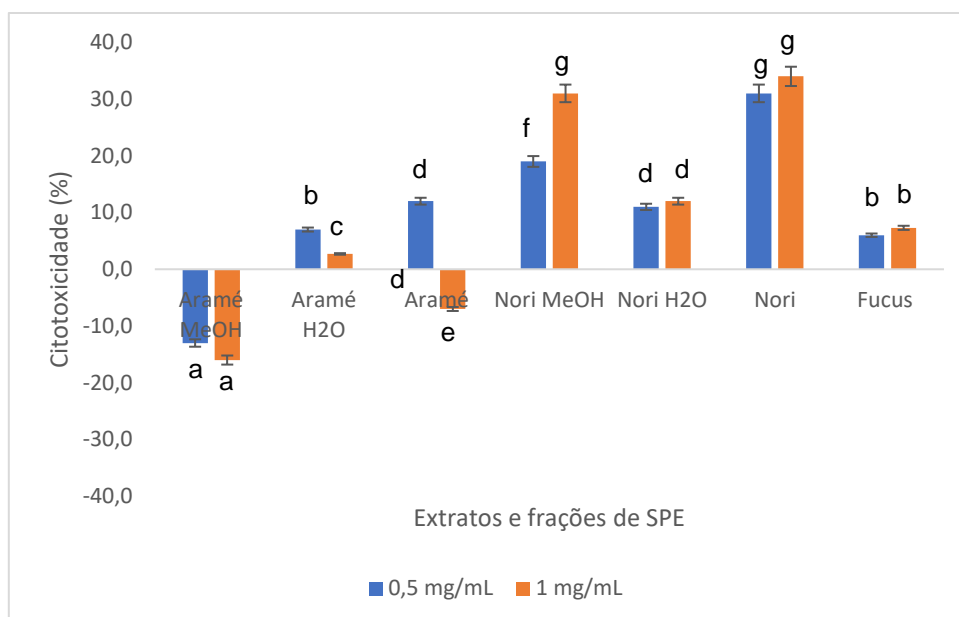


Figura 11 - Citotoxicidade de células Hep-G2, para extratos e respetivas frações de metanol e água, a concentrações de 0,5 e 1 mg/mL. a-g são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.

De acordo com o critério que extratos são considerados tóxicos quando apresentam uma concentração inibitória de 50 % do crescimento celular (IC_{50}) de citotoxicidade com uma concentração de 0,1 mg/mL [258], pode-se assim concluir que os extratos utilizados não apresentaram hepatotoxicidade, sendo o extrato da Nori o que apresentou maior morte celular, mas ainda assim nunca superior a 40 %. Em oposição, para os casos do extrato de Aramé e as suas frações à concentração de 1 mg/mL, verificou-se um crescimento de células superior às células controlo e, portanto, estas amostras apresentam compostos que podem ser considerados nutrientes promovendo o crescimento celular, estes compostos são os de natureza mais apolar.

Como se pode constatar na figura 12, resultados semelhantes foram obtidos para as células Caco-2, isto é, os extratos não apresentam citotoxicidade, sendo que os extratos de Fucus e o purificado de Aramé MeOH os que apresentaram maiores valores de morte ainda que nunca superior a 50%. Contudo, o extrato purificado de Nori H₂O à concentração de 1mg/mL, demonstrou um crescimento celular face ao controlo, conseqüentemente, os seus compostos podem mais uma vez considerados nutrientes.

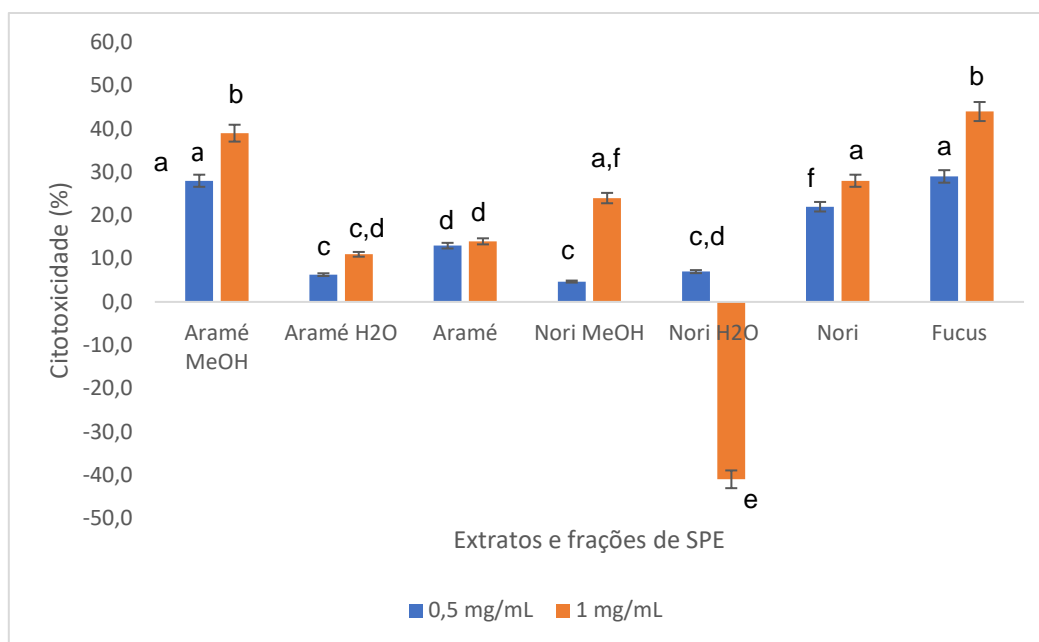


Figura 12 - Citotoxicidade de células Caco-2, para extratos de Aramé, Nori e Fucus nativos (A, N e F) e purificados: metanol (M) e água (A), a concentrações de 0,5 e 1 mg/mL. a-f são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.

Uma vez que, quer os extratos quer as respetivas frações não apresentaram qualquer tipo de citotoxicidade ao nível das células do fígado e ao nível das células do intestino às concentrações utilizadas, foram consideradas seguras para serem utilizadas nos estudos subsequentes. Adicionalmente apresentam potencial para poderem ser utilizadas em segurança quer na alimentação humana quer em terapias aplicadas, de acordo com atividades biológicas exibidas.

4.2.2. Atividade Antioxidante dos extratos e frações

A atividade antioxidante dos extratos e das respetivas frações foi determinada recorrendo ao método do DPPH, que avalia a capacidade de as amostras analisadas reduzirem o radical DPPH. Os resultados obtidos encontram-se na figura 13. Para o extrato da Aramé, foi ainda determinada o EC_{50} , a concentração do extrato que exhibe 50 % de atividade antioxidante, uma vez que apresentou a melhor atividade antioxidante.

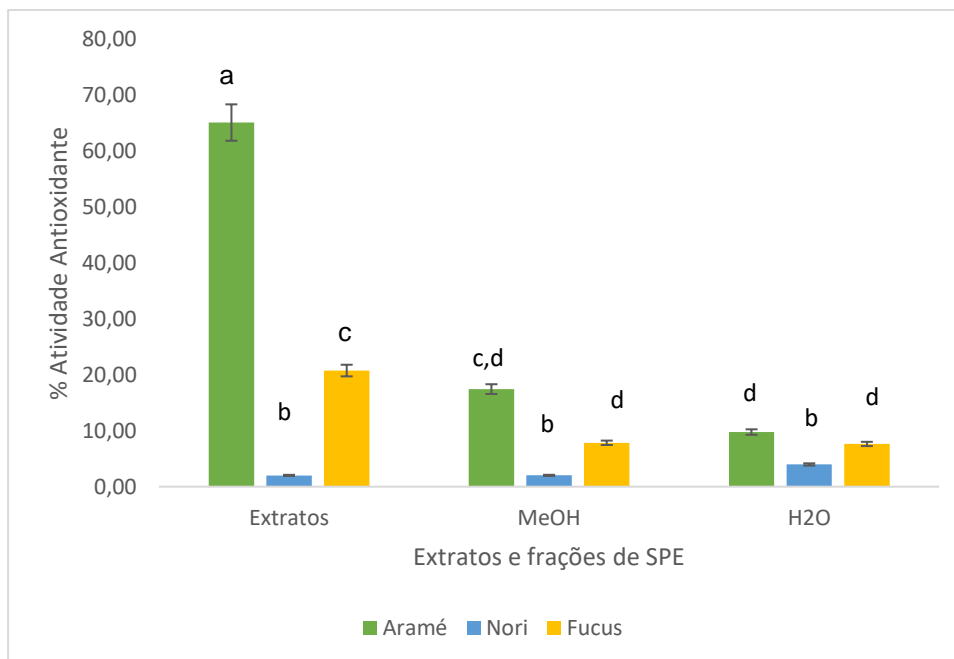


Figura 13 - Percentagem da atividade antioxidante para os extratos Aramé, Nori e Fucus e frações purificadas por SPE, fração da água (H₂O) e outra fração metanol (MeOH), a uma concentração de 0,25 mg/mL exceto para as amostras do Fucus analisadas a 0,29 mg/mL. As letras a-d correspondem a valores que são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.

Pode observar-se, através da figura 13, o extrato de Aramé e, em oposição, o extrato de Nori e as suas frações, Nori MeOH e Nori H₂O, apresentaram atividade antioxidante muito baixa. Em qualquer um dos casos, a atividade antioxidante dos extratos foi expressivamente mais elevada que as das frações correspondentes. O que se pode justificar pela sinergia dos compostos quando não há fracionamento [259]. Em relação ao EC₅₀, a concentração de extrato de Aramé que apresentou 50% de atividade antioxidante foi 0,174 mg/mL obtida através da curva do anexo 2.2.

Nos dados reportados na literatura, para o extrato de Fucus, se considerarmos a mesma concentração, foi obtida uma atividade antioxidante de cerca de 45 % [44], superior à obtida neste trabalho. Esta diferença de valores pode estar associada ao local da colheita e às condições ambientais [146, 147]. Em relação ao EC₅₀ ao extrato de Aramé na literatura, para um extrato obtido com recurso a solventes orgânicos, obteve-se maior atividade antioxidante com um valor do EC₅₀ de 8,81 µg/mL [260]. No entanto, para outro extrato aquoso de Aramé, à mesma concentração foi obtido um valor semelhante [261]. Para o extrato de Nori, a uma concentração de 0,10 mg/mL, está reportado um valor da atividade antioxidante de cerca de 2 % [262], portanto, para a concentração 0,25 mg/mL obteve-se a mesma atividade antioxidante.

Com base nos resultados obtidos no ponto 4.2.1, pode também concluir-se que de entre os extratos, o extrato de Aramé foi o que apresentou maior quantidade de fenóis totais e, portanto, estes poderão ser responsáveis pela sua maior atividade antioxidante. Deve salientar-se, no entanto, que a fração de Aramé em metanol de entre todas as amostras foi a que apresentou maior quantidade de fenóis totais, no entanto demonstrou não exibir a maior atividade antioxidante, mais uma vez evidenciando a importância da sinergia dos compostos quando estão em conjunto nos extratos, relativamente a quando estão fracionados. Devido a isto, para os restantes ensaios de atividade biológica foram utilizados somente os extratos de algas.

4.2.2. Inibição da acetilcolinesterase pelos extratos das algas

Com o objetivo de estudar se os extratos poderiam ser utilizados no tratamento da doença de Alzheimer, procedeu-se à determinação da inibição do AChE e, para isso foram usados os três extratos de algas estudados neste trabalho. No entanto as concentrações de cada extrato são diferentes de acordo com a disponibilidade de massa seca de extrato. Para a Aramé utilizou-se uma concentração de 3 mg/mL, para a Nori utilizou-se 1,5 mg/mL e para o Fucus utilizou-se uma concentração de 1,177 mg/mL. Como referido, devido aos resultados obtidos anteriormente, que indicam que a sinergia dos compostos melhora a atividade antioxidante, neste ensaio não se utilizaram as frações dos extratos purificadas. Nos anexos 2.3., encontram-se os resultados utilizados para determinar a velocidade de reação para cada extrato. Na figura 14 encontram-se os resultados obtidos para a inibição do AChE de cada um dos extratos.

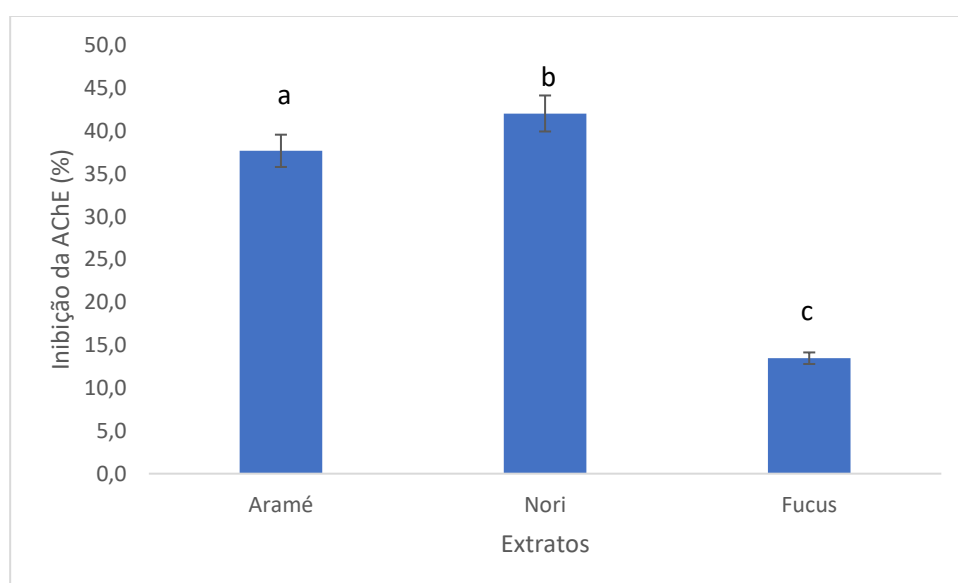


Figura 14 - Inibição do AChE para os extratos de algas Aramé (3 mg/mL), Nori (1,5 mg/mL) e Fucus (1,177 mg/mL). a, b, c são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.

Pela análise dos resultados da figura 14, pode-se concluir que à concentração usada, os extratos apresentaram uma percentagem inibição do enzima AChE abaixo dos 50%. Os extratos Fucus e Aramé foram os que apresentaram menores percentagens de inibição, sendo o extrato da Nori maior uma vez que, para 1,5 mg/mL de extrato apresentou 42 ± 2 % de inibição. De ressaltar que este extrato foi o que apresentou maior quantidade de polissacáridos $0,583 \pm 0,004$ mg PE/mg massa seca, que corresponde a 61 % e de floroglucinol $0,0156$ mg/mL que corresponde a 1,5 %.

Determinou-se assim a atividade inibitória do floroglucinol, com o objetivo de se entender se a presença deste composto poderia ser relacionada com a maior atividade inibitória do extrato da Nori.

Utilizou-se uma concentração de $0,1$ mg/mL de floroglucinol, uma vez que, o conteúdo de fenóis totais na Nori é inferior a 10 % [263]. Obteve-se uma atividade inibitória de 15 ± 2 % para o floroglucinol, ou seja, pode-se concluir que a atividade inibitória da AChE apresentada pela Nori não se deve a este composto, uma vez que, este está presente numa concentração baixa. O alto valor de inibição da AChE, apresentado pela Nori, pode indicar que a sinergia dos compostos melhora o poder de inibição do floroglucinol e pode estar associada a outros polissacáridos presentes no extrato, como referido anteriormente (4.1) polissacáridos de natureza menos polar como a celulose, xilanos e mananos.

Comparando os valores obtidos com os valores da literatura, para o extrato de Fucus, está reportado que, para uma concentração de 1 mg/mL, uma atividade inibitória de AChE muito inferior de $4,20 \pm 0,36$ % [44]. Para extratos de Aramé com solventes orgânicos e purificados por outras metodologias a uma concentração inferior de $0,025$ mg/mL foi reportada uma atividade de $68,01 \pm 1,37$ % [262]. Esta diferença pode dever-se ao método de obtenção dos compostos bioativos presentes nesta alga e que têm esta potencialidade. De modo semelhante, para o extrato de Nori para uma concentração muito inferior de $0,010$ mg/mL foi reportada uma atividade superior [264]. Neste trabalho optou-se por realizar extratos aquosos de modo a simular a ingestão das algas através da alimentação e, neste caso, o extrato de Nori foi o que demonstrou maior potencialidade de ser explorado para aplicação na problemática da doença de Alzheimer.

4.2.3. Inibição da HMGR pelos extratos das algas

Com o objetivo de avaliar a capacidade de os extratos de algas marinhas serem utilizados na prevenção/tratamento da hipercolesterolemia determinou-se a inibição do

HMGR. Para a determinação da atividade inibitória do HMGR foram usados os três extratos de algas estudados neste trabalho, com concentrações de 0,25 mg/mL e um inibidor padrão, a pravastatina. Nos anexos 2.4., encontram-se os resultados dos ensaios para determinar a velocidade de reação para cada extrato. Na figura 15, encontram-se os resultados obtidos para a inibição do HMGR de cada um dos extratos.

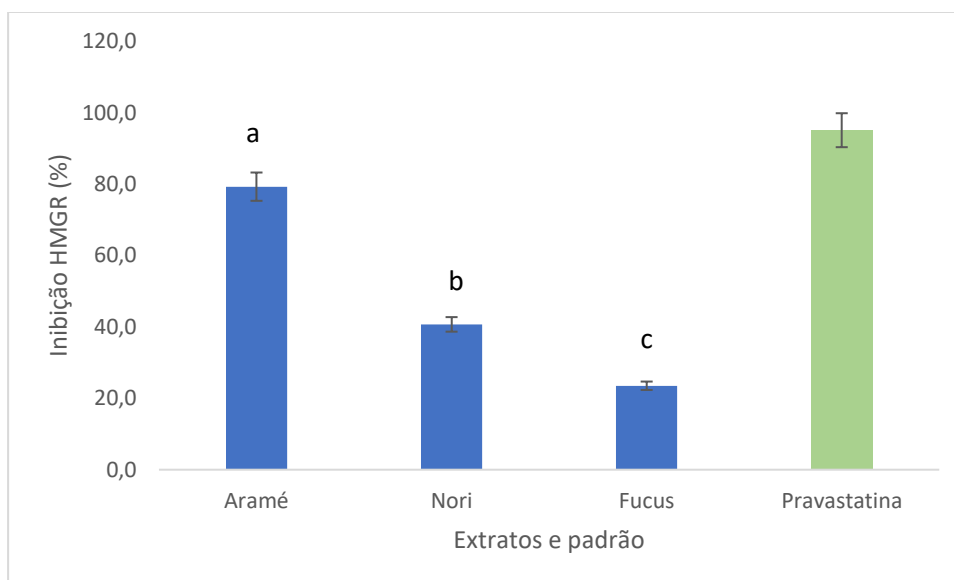


Figura 15 - Inibição da HMGR para os extratos de algas Aramé, Nori e Fucus a 0,25 mg/mL. a, b, c são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.

Com a análise dos resultados (figura 15) foi possível concluir que tanto o extrato da alga Nori como o extrato do Fucus à concentração usada de 0,25 mg/mL apresentaram uma inibição do HMGR inferior a 50 %, enquanto o extrato da alga Aramé demonstrou um poder inibitório mais elevado, tendo-se obtido uma inibição superior a 75 %.

A pravastatina é um dos fármacos a que se recorre para controlar a síntese de colesterol no fígado, neste caso obteve-se uma percentagem de inibição de $95,1 \pm 0,8$ %. O seu poder de inibição está muito próximo de 100 %, apesar do kit não mencionar a concentração da pravastatina, os extratos de algas marinhas sendo produtos naturais com inibições superiores a 50 % podem ser potencialmente usados em terapias combinadas. Para além disso e, uma vez que a pravastatina é um fármaco puro e a sua inibição apesar de superior, é tão elevada como a inibição do extrato de Aramé 79 ± 7 %, pode-se concluir que este extrato tem um bom poder de inibição do HMGR logo, consegue ter um efeito sobre a síntese do colesterol endógeno, um dos alvos terapêuticos da hipercolesterolemia.

Na literatura foi reportado para um extrato de Fucus a uma concentração superior de 1 mg/mL uma atividade muito inferior de inibição do HMGR de $1,07 \pm 0,65$ % [44]. Para as outras duas algas, ainda não há resultados reportados na literatura, sendo a primeira vez que este estudo foi feito demonstrando o potencial dos extratos das algas na problemática da hipercolesterolemia. Com base nestes resultados pode-se concluir que, o extrato de Aramé é o mais adequado para o tratamento/prevenção da hipercolesterolemia através da inibição da síntese de novo colesterol.

4.3. Estudo do efeito dos extratos em linhas celulares Caco-2 e HepG2

4.3.1. Ação na barreira gastrointestinal – permeação do colesterol e de compostos bioativos

De modo a avaliar como os extratos de algas agem quando contactam com a barreira gastrointestinal, utilizou-se um modelo da linha celular Caco-2 que, após a diferenciação simula a barreira gastrointestinal e que é utilizado para estudos de permeação de compostos [248]. Por um lado, avaliou-se a permeação do colesterol com o objetivo de estudar a capacidade dos extratos na prevenção/ tratamento da hipercolesterolemia e, conseqüentemente, na diminuição do risco de DCV e, por outro, a permeação dos compostos bioativos dos extratos para avaliar se atravessariam a barreira gastrointestinal.

Os resultados obtidos para o efeito dos extratos na redução da permeação do colesterol através do modelo da barreira gastrointestinal em comparação com o fármaco ezetimiba habitualmente prescrito para o efeito, encontram-se na figura 16.

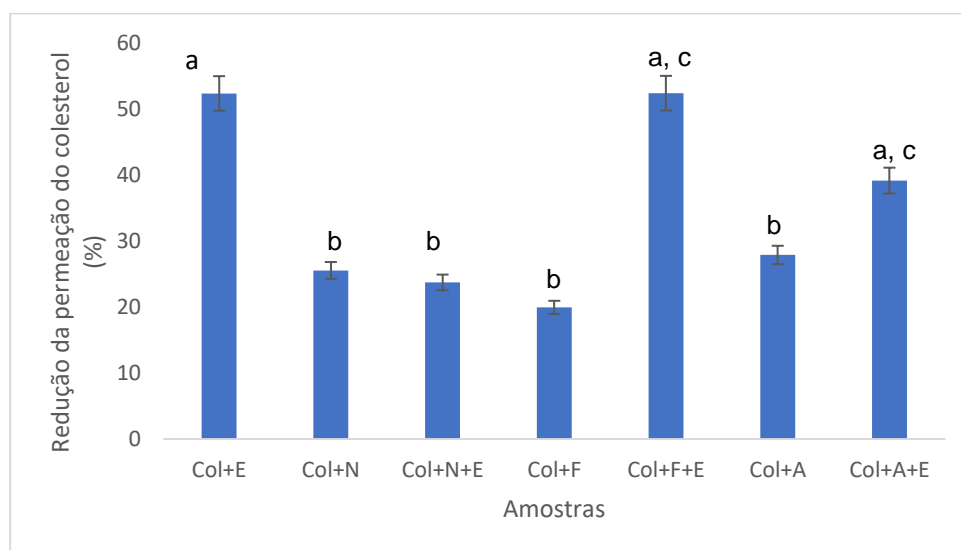


Figura 16 – Redução da permeação do colesterol (col) na barreira gastrointestinal na presença de Aramé (A), Nori (N), Fucus (F) e ezetimiba (E), em relação ao colesterol sozinho. a a d são considerados estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.

Com a análise dos resultados, pode concluir-se que, apesar de os extratos da Aramé (Col+A), do Fucus (Col+F) e da Nori (Col+N) reduzirem a permeação do colesterol, em cerca de 30 %, estes não são tão eficazes como o fármaco ezetimiba (Col + E), que reduziu mais de 50 %. No entanto, note-se que os extratos são uma mistura de compostos e a ezetimiba é uma molécula pura.

Nos casos em que os extratos foram colocados em contacto com o modelo na presença de ezetimiba, para o extrato de Fucus (Col+F+E) e o de Aramé (Col+A+E) verifica-se uma melhoria substancial da redução da permeação do colesterol e da mesma ordem de grandeza que obtido para a ezetimiba (Col+E), sugerindo que estes não interferem com o efeito do fármaco. No caso do extrato de Nori na presença de ezetimiba (Col+N+E) o efeito na redução da permeação do colesterol é semelhante ao do extrato Nori (Col+N), o que pode indicar que os compostos presentes nesta alga competem com a ezetimiba ou que ocorrem interações com o fármaco limitando a sua atuação.

Quanto aos resultados reportados na literatura, para a redução da permeação do colesterol somente se encontram resultados para o extrato de Fucus, onde ocorreu uma redução superior $45,3 \pm 4,4$ % [44], enquanto, neste trabalho se obteve 20 ± 1 % (Col + F). A diferença destes resultados pode dever-se ao ensaio da literatura ter sido efetuado com um extrato purificado por SPE de MeOH e os compostos presentes do extrato estarem em maior concentração. Este trabalho confirma pela primeira vez que os extratos de Aramé e Nori têm efeito sobre a barreira gastrointestinal levando a uma redução na permeação do colesterol proveniente da dieta.

Foi adicionalmente avaliada a permeação dos compostos presentes nos extratos das algas, uma vez que, nos capítulos anteriores foi visto que os extratos apresentam atividade antioxidante, atividade de inibição da AChE e HMGR, consequentemente, apresentam benefícios para a saúde e, portanto, caso ocorra a sua ingestão é necessário averiguar se estes têm a capacidade de permear a barreira gastrointestinal e atingir outros alvos no organismo. Os resultados obtidos encontram-se na figura 17.

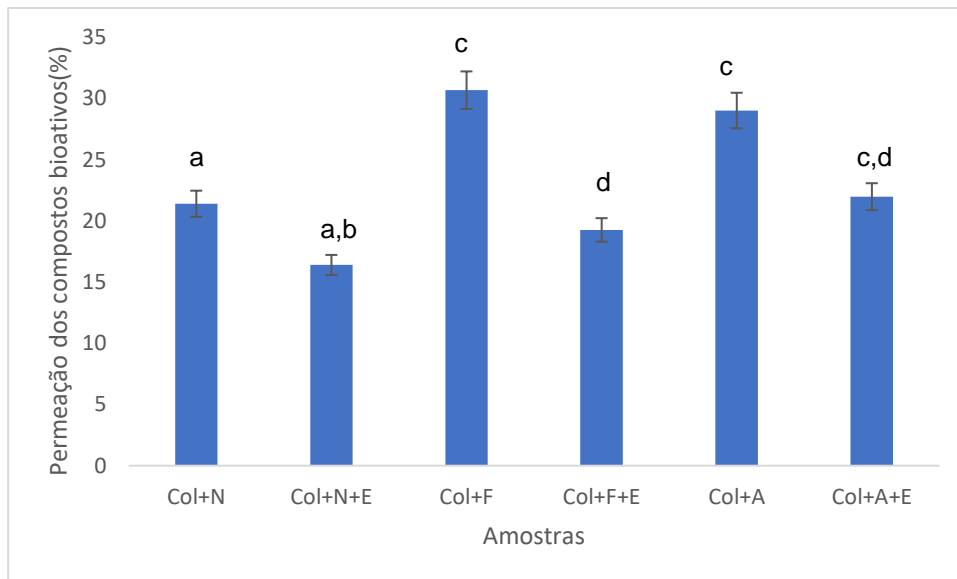


Figura 17 - Percentagem de permeação dos compostos bioativos dos extratos de algas na presença de colesterol e ezetimiba. Onde col é o colesterol; E é a ezetimiba; A é a Aramé; F é o Fucus; e N é a Nori. a - d são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.

Com base nestes resultados, pode concluir-se que os compostos bioativos dos extratos de algas conseguem permear a barreira gastrointestinal em cerca de 20 a 30 %. Salienta-se que para o extrato da Aramé (Col+A) e do Fucus (Col+F) se obteve sensivelmente a mesma permeação de compostos bioativos, enquanto, o extrato da Nori apresentou uma permeação mais baixa, principalmente na presença de ezetimiba (Col + N). Notou-se, ainda que nas condições testadas em que a permeação na barreira gastrointestinal ocorreu na presença da ezetimiba e colesterol, verificou-se no geral uma diminuição da permeação dos compostos do extrato, sugerindo, tal como referido anteriormente que possivelmente possam estar envolvidos alguns transportadores de membrana semelhantes, como o NPC1L1 e os transportadores ABC.

Em suma, ao analisar a permeação do colesterol, na barreira gastrointestinal, pode-se concluir que, os compostos das algas podem passar a barreira gastrointestinal, tanto pelos transportadores ABC como pela NPC1L1, nesta há uma interação com a ezetimiba diminuindo a permeação do colesterol. Nota-se também que, se o objetivo for a terapia combinada do fármaco e das algas marinhas comestíveis, o extrato de Fucus ou o extrato de Aramé são a melhor opção, uma vez que, apresentam a mesma capacidade de redução da permeação que o fármaco. No caso da Nori, ao proceder à terapia combinada, a redução do colesterol será muito semelhante do que ao consumir apenas a alga.

Como foi referido no ponto 1, o ezetimiba é um fármaco cujo alvo é a proteína NPC1L1, levando à redução da permeação do colesterol proveniente da dieta [16] No entanto, as alterações na permeação do colesterol podem ocorrer não somente associadas à proteína NPC1L1, mas ainda a outras proteínas transportadoras do colesterol, ABCG5 e ABCG8, que são responsáveis pela excreção do colesterol nos enterócitos [45, 46], o que será avaliado na secção 4.4.

Neste capítulo foi visto que os extratos têm efeito sobre a hipercolesterolemia e que têm a capacidade de permear a barreira gastrointestinal, então, também é necessário estudar o efeito dos extratos nas células, mais concretamente no metaboloma, se forem ingeridos.

4.3.2. Análise por Espetrometria de Massa dos metabolitos extraídos

De modo a avaliar os efeitos benéficos, frequentemente associados à incorporação na dieta de extratos de algas comestíveis, foi utilizada uma abordagem metabolómica. Nesse sentido, para cada um dos extratos das algas em estudo foi analisado o efeito sobre os metabolitos celulares das linhas celulares do fígado e intestino, Hep-G2 e Caco-2. Os metabolitos produzidos pelas células em resposta ao contacto com os referidos extratos, foram extraídos, analisados por cromatografia líquida associada a espectrometria de massa de elevada resolução (LC-QTOF-MS) em modo positivo e modo negativo, identificados através da sua razão carga/massa (m/z) recorrendo às bases de dados disponíveis no software Metaboscape. Os metabolitos celulares de células tratadas com o extrato de alga foram estatisticamente comparados com os metabolitos de células controlo não sujeitas ao referido tratamento, utilizando o software Metaboscape. Adicionalmente, para o modo positivo, foi efetuada uma análise das vias metabólicas associadas às alterações identificadas nos metabolitos com recurso a uma ferramenta na plataforma Metaboanalyst.

Métodos de redução de dimensionalidade, como a análise de componentes principais (PCA- *Principal Component Analysis*) e a regressão por projeção em estruturas latentes (PLS – *Projection on Latent Structures*) foram aplicados para identificar semelhanças e diferenças em metabolitos e/ou nas intensidades dos metabolitos celulares em células controlo relativamente às tratadas e, atribuir uma importância aos metabolitos alterados consoante a variação encontrada. Foi efetuada também a representação gráfico em Vulcano que relaciona o rácio da abundância dos metabolitos presentes nas células tratadas relativamente ao controlo (*fold change*), no eixo dos x como \log_2 (*fold change*), e o *p-value* que indica a significância estatística dessa variação,

no eixo do y como $-\log_{10}(p\text{-value})$, tendo sido considerados significativos os que apresentam $p\text{-value}$ inferior a 0,05 e um *fold change* entre 0,5 e 1,7.

- **Aramé**

No caso da avaliação da ação do extrato da alga Aramé sobre os metabolitos celulares das células Caco-2 e Hep-G2 e, a partir da análise por espectrometria de massa, quer em modo positivo quer em modo negativo, foi possível constatar-se na análise por PCA para as amostras analisadas, Figura 18 b) e 19 b), que os metabolitos nas células controlo (azul) são diferentes comparativamente com os metabolitos das células em contacto com o extrato (laranja), verifica-se que as replicas estão correlacionadas entre si, no entanto formando grupos isolados e separados das células controlo relativamente às células tratadas. Indicando que o extrato da alga Aramé teve como efeito uma alteração nos metabolitos celulares quer nas células Hep-G2, quer nas células Caco-2.

No caso, da análise por PLS (Figura 18 c) e 19 c)) foi possível constatar-se que os metabolitos que têm maior importância (maiores valores de y) são os que mais diferem entre as células controlo e as células tratadas, respetivamente nas células Caco-2 e Hep-G2. A análise do gráfico Volcano, Figura 18 a) e 19 a), permitiu ainda identificar quais os metabolitos que apresentam maior variação entre células controlo e tratadas, isto é, elevados $\log_2(\text{fold change})$, mas com significância estatística ($p\text{-values} < 0,05$), ou seja, elevado valor de $-\log_{10}(p\text{-value})$. Sendo que valores m/z que se encontram no quadrante superior direito ou no quadrante superior esquerdo das figuras indicam os metabolitos que estão diferencialmente mais abundantes no grupo controlo relativamente ao grupo das células tratadas, à esquerda e vice-versa. Os metabolitos que têm um *fold change* relativamente baixo e/ou não são significativamente diferentes entre as células controlo e as células tratadas, aparecem perto do centro e abaixo da linha limite. As Figuras 18 d) e 19 d) indicam os metabolitos que foram encontrados como estando mais abundantes nas células controlo, à direita, relativamente às células tratadas, nestas os metabolitos que foram encontrados estão à esquerda. Nos *heatmaps* respetivos, representados nas Figuras 20 e 21 para as células Caco-2 e Hep-G2, respetivamente foi ainda possível verificar a verde os metabolitos mais abundantes ou a vermelho os menos abundantes encontrados nas células controlo e células tratadas.

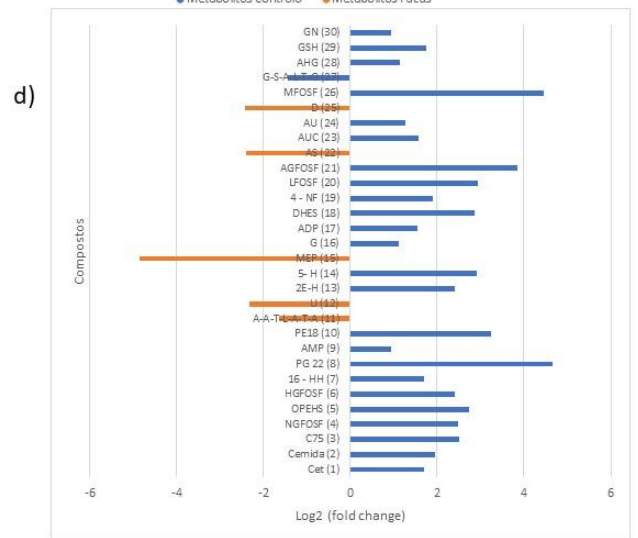
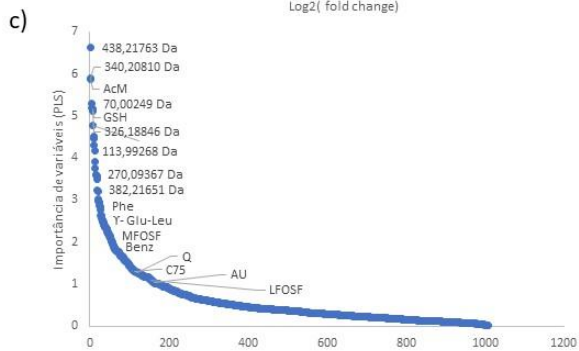
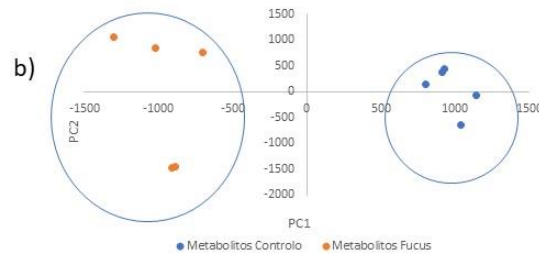
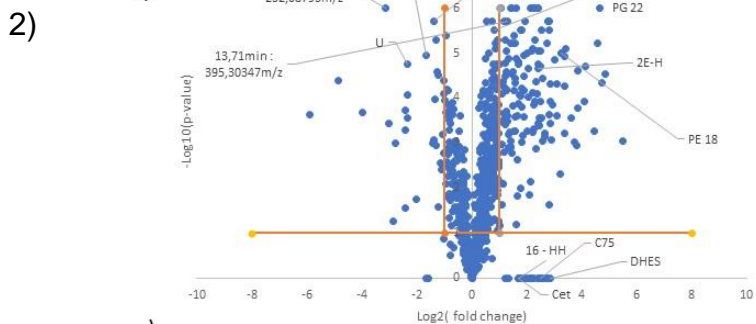
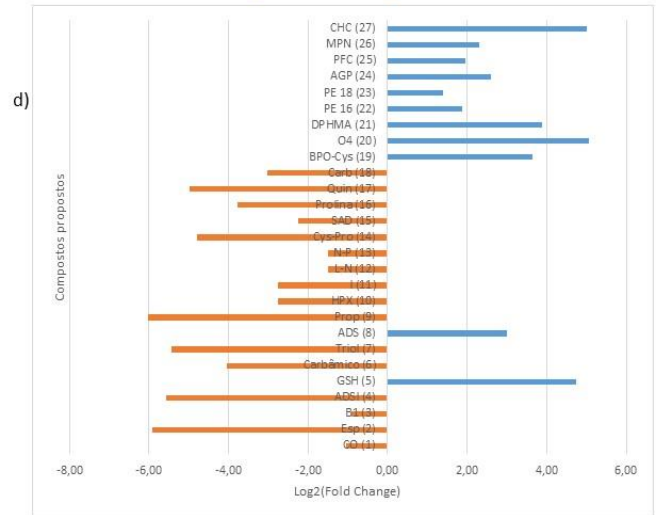
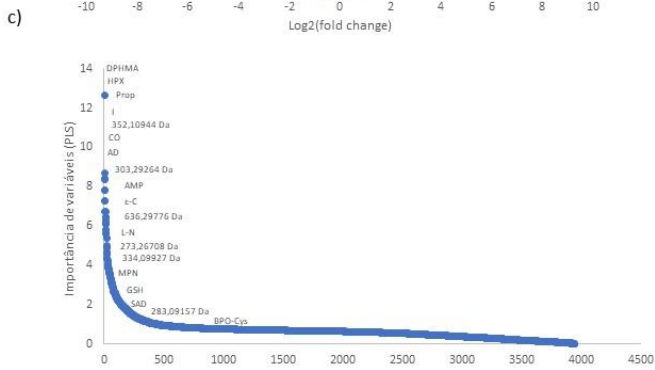
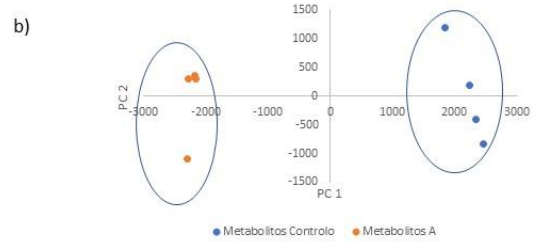
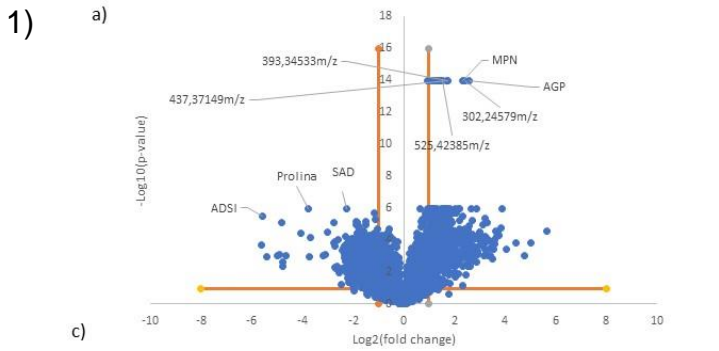
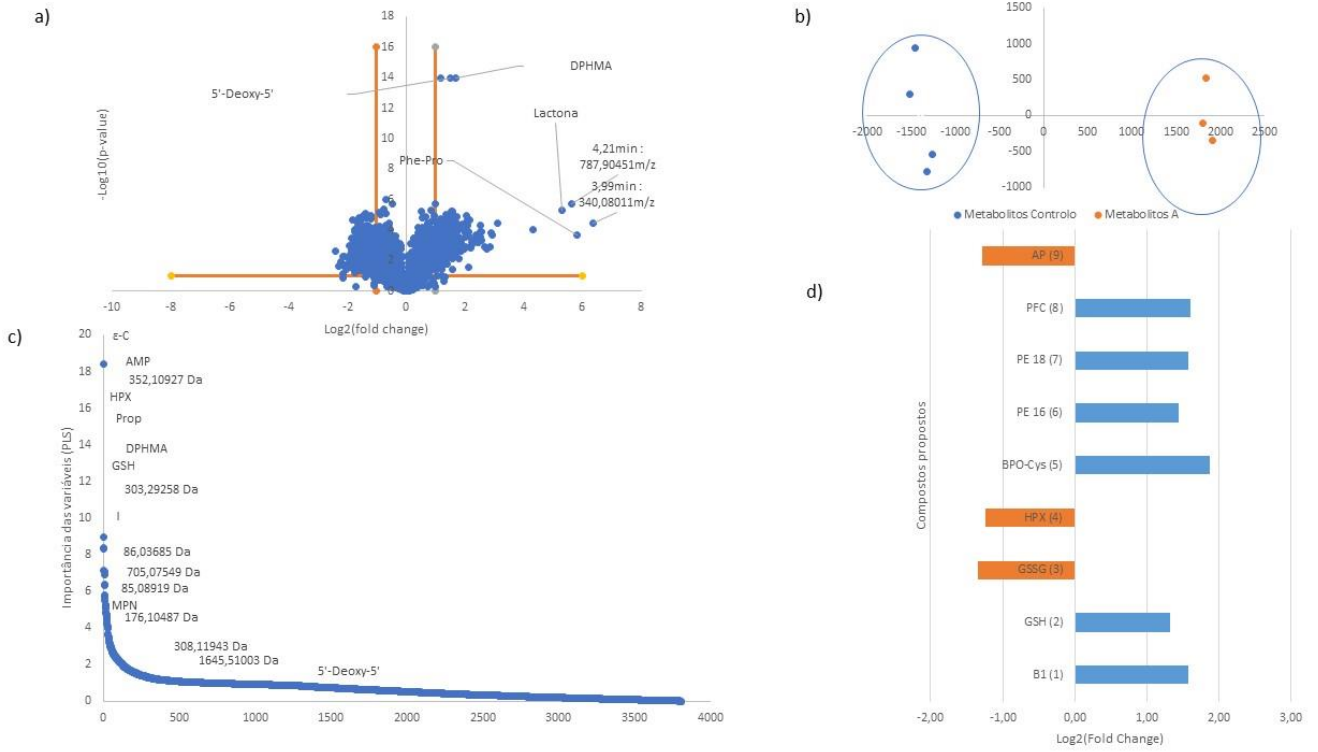


Figura 18 - Análise dos compostos que variam na presença ou ausência de Aramé, para as células Caco-2, no modo positivo (1) e modo negativo (2). a) gráfico do volcano; b) gráfico PCA; c) gráfico PLS; d) gráfico log₂(fold change).

1)



2)

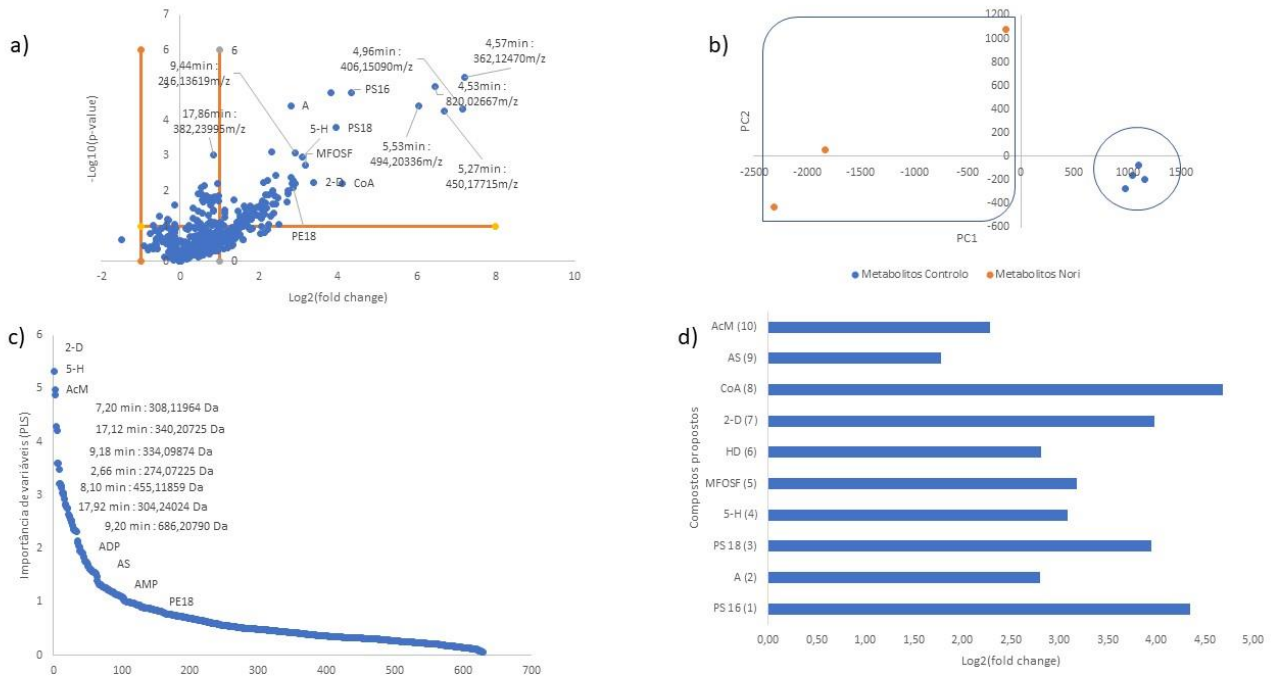


Figura 19 - Análise dos compostos que variam na presença ou ausência de Aramé, para as células Hep-G2, no modo positivo (1) e modo negativo (2). a) gráfico do volcano; b) gráfico PCA; c) gráfico PLS; d) gráfico log2(fold change).

Composto proposto modo negativo	Caco-2	Caco-2+Aramé
Cetileucina (Cet)	58869	18238
2-ceto-N-[6-(4-neopentilpiperazino)-3-piridil]-2-(2-fenil-5,6,7,8-tetra-hidroindolizin-3-yl)acetamida (Cemida)	73430	18972
C75 trans (C75)	43338	7634
1-nonadecanóil-glicero-3-fosfoserina (NGFOSF)	68979	9367
2-[3-[3-[3-(3-Octoxipropoxi)propoxi]propoxi]propoxi]etil hidrogenossulfato (OPHES)	27328	4075
1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (HGFOSF)	8704,5	1644
Ácido 16-hidroxi-hexadecanóico (16-HH)	3502	1078
PG(22:6/4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0,0) (PG22)	19265,5	767
Monofosfato de guanosina (AMP)	18542	9722
PE(18:1(9Z)/0,0) (PE18)	13092,5	1388
H-Ala-Ala-Thr-Lys-Ala-Thr-Ala-al (A-A-T-L-A-T-A)	1085	3394,5
Uridina (U)	7106,5	35621,5
2E-Hexenediolicarmitina (2HE)	17532,5	3283
Ácido 5-hidroxiciclohexanoico (5H)	145634	19471,5
2-[1-(Metilidissulfamilo)etil]pirazina (MEP)	311,5	8962
1-(3-Etilisulfonilciclohexil)-2-metil-3-[2-(5-metil-2-teril)sulfonilamino]etilguanidina (G)	9233,5	4249
ADP	93313	31713,5
11-(2-Dodecoxietoxi)etoxi)etil hidrogenossulfato (DHES)	48977	6739,5
4-Nitrofenol (4-NF)	2853,5	765
lisofosfatidietanolamina (LFOSE)	12199,5	1584,5
2-araquidonil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (AGFOSE)	6986,5	482,5
ácido succínico 2-[2-acetamido-3-carboxi-propano]ilamino] (AS)	2365,5	12492,5
Ácido 1,11-Undecano dicarboxílico (AUC)	6681,5	2245
Ácido Undecanoico (AU)	5122,5	2111
Desoxinosina (D)	831,5	4439,5
1-(2-Metoxi-octadecanil)-sn-glicero-3-fosfoserina (MFOSE)	23058	1049,5
H-Gly-Ser-Ala-Lys-Tyr-Gln-OH (G-S-A-L-T-G)	1407	3814,5
Ácido 3-hidroxi-3-metil-glutáico (AHG)	16936,5	7723
Glutationa, oxidada (GSSG)	29931	8840
Guanosina (GN)	36559,5	19088,5

b

Composto proposto modo positivo	Caco-2	Caco-2+Aramé
1-[2-[1-[2-[2-[2-(2-glicilamino)acetil]amino]acetil]amino]acetil]amino]amino]5-guanidino-pentanoil]prolina (AGP)	45337	7552
1-Monopalmitina (MPN)	125685	25283
Succinil adenosina (SAD)	23012	109916
(2S)-1-[2(S)-2-(mercaptometilamino)propano]il prolina (Prolina)	1189	16298
(1,4-dimetil-4-propil-heptil)-(2-metilbutil)ammina (DPHMA)	464590	31263
1-Palmitoilfosfatidilcolina (PFC)	25622	6572
3-amino-2,3-dideoxi-sclero-inosose (ADSI)	1426	67543
Inosina (I)	32804	221444
Cys-Pro	1408	39137
N-Propionilmetionina (N-P)	5073	14371
Colina (CO)	154823	320119
A denilosuccinato (ADS)	25171	3170
Ácido carboxílico (2R,4S)-2-[(1R)-2-[(2-[[2-amino-2-carboxi-etil]disulfanil]-1-carboxi-etil]amino)-2-ceto-1-(2-fenilacetil)amino]etil]-5,5-dimetil-tiazolidina-4 (Carb)	3515	28431
Ácido (2-ceto-2-tiazolidin-3-il-etil) carbâmico (Carbâmico)	2681	44430
Benzilpenicilil-cisteina (BPO-Cys)	84954	6740
1-(9Z-Octadecenoil)-sn-glicero-3-Fosfoetanolamina (FE 18)	14283	5468
Ácido propiónico 3-[7,4-(2-acetamido-4-metil-tiazol-5-il)sulfonil]piperazino]-5-metil-1,2,4-tiazolo[1,5-a]pirimidin-6-il)etil ester (Prop)	2997	194426
Fosfatidietanolamina (FE 16)	12449	3408
Ácido succínico O-4-[4-[(E)-2-(3-hidroxi-5-metil-fenil)vinil]etil] ester O-1-(2-keto-3,5,5-trimetil-4-vinil-ciclohex-3-en-1-il) ester (O4)	3254	98
Tiamina (B1)	8975	16937
Espermina (Esp)	538	32471
1-[5-(benzil)io]-1,3,4-tiazol-2-il]-5-(3,4-dietoxifenil)-4-[2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il(hidroxi)metileno]pirrolidina-2,3-quinona (Quin)	574	18014
Glutationa (GHS)	97111	3612
Hpoxantina (HPX)	48934	331014
(1S,2R)-1-[3-(metil)io]-1H-pirazol-5-il]propano-1,2,3-triol (Triol)	1362	58389
L-Norieucina (L-N)	119588	339655

a

Figura 20 – Heatmap dos compostos propostos que variam na presença ou ausência de Aramé, nas células Caco-2 (a) modo positivo e (b) modo negativo, com base nas intensidades médias, com intervalo de confiança de 95 %.

a		b	
Compostos propostos modo positivo	Hep-G2	Compostos propostos modo negativo	Hep-G2
5'-metiliodenosine (5'-Deoxy-5')	52084	Ácido 2-Hidroxidodecanoico (HD)	5908
(1,4-dimetil-4-propilheptil)-(2-metilbutil)amina (DPHMA)	107692	fos brilisima (FSN)	4618
6-O-sinapoyl-D-glucono-1,5-lactona (Lactona)	10046	PS(16:00:0)(PS16)	4817
3-amino-2,3-dideoxi- β -D-ribose (ADS)	3756	Coenzima A (CoA)	16957
Espermina (Esp)	2339	Ácido 5-hidroxicosatetraenoico (5-H)	153368
L-fenilalanil-L-treonil-L-glutamil-L-seril-L-leucil-L-profil-L-prolina (Phe-Pro)	9805	Ácido 2-Dodecilbenzenesulfonico (2-D)	148603
(2S)-1-[(2S)-2-(mercaptometilamino)propanoil]prolina (Prolina)	3715	2E-Hexenedioilarnitina (2E-H)	7323
Glutationa (GSH)	94977	C75 trans (C75)	18763
ϵ -Caprolactama (ϵ -C)	403457	Uridina (U)	5189
Tiamina (B1)	9766	Alisina (A)	1619
1-[5-(benzilito)-1,3,4-tiadiazol-2-il]-5-(3,4-dietoxifenil)-4-[2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il(hidroxi)metileno]pirrolidina-2,3-quinona (Quin)	1043	Hipoxantina (HPX)	3358
Ácido carboxílico (2R,4S)-2-[(1R)-2-[(2-amino-2-carboxietil)isufanil]-1-carboxietil]amino]-2-eto-1-[(2-fenilacetil)amino]etil]-5,5-dimetil-tiazolidina-4 (Carb)	3635	1-(9Z-Octadecenil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (P18)	40511
Ácido propiônico 3-[7-[4-(2-acetamido-4-metil-tiazol-5-il)sulfonilpiperazino]-5-metil-1,2,4-triazol-1,5-a]primidin-6-il]etil ester (Prop)	5893	Ácido 16-Fenilolioxipalmítico (16-FP)	1760
	66625	8-Amino-2-(3,4-dihidroxifenil)-3-hidroxi-6-metil-cromona (Cromona)	1733
	10909	ácido acético 2-[4-[(E)-1-(4-hidroxifenil)-2-fenil-but-1-enilfenil]AA)	1490
	148527	1-(3-Etilsulfonilnicotil)-2-metil-3-[2-[(5-metil-2-thienil)sulfonilamino]etil]guanidina (G)	8932
		4-Nitrofenol (4-NF)	1882
			807
			701
			655
			4931
			39211
			42759
			2545
			8075
			18536
			299
			14436
			21807
			4930
			3947
			4042
			22258
			4163

Figura 21 - Heatmap dos compostos propostos que variam na presença ou ausência de Aramé, nas células Hep-G2 (a) no modo positivo e (b) no modo negativo, com base nas intensidades médias, com intervalo de confiança de 95 %.

Em resumo, relativamente à ação que a Aramé tem sobre as células Caco-2 foi verificado que os metabolitos que sofreram maior variação em cada caso foram os que se encontram nos heatmaps representados, os compostos a verde correspondem aos metabolitos mais abundantes ou a vermelho os menos abundantes encontrados nas células controlo e células tratadas, em modo positivo e em modo negativo. Foi adicionalmente efetuada uma análise das vias metabólicas que poderiam estar

associadas aos metabolitos alterados, recorrendo à plataforma Metaboanalyst, Figura 22.

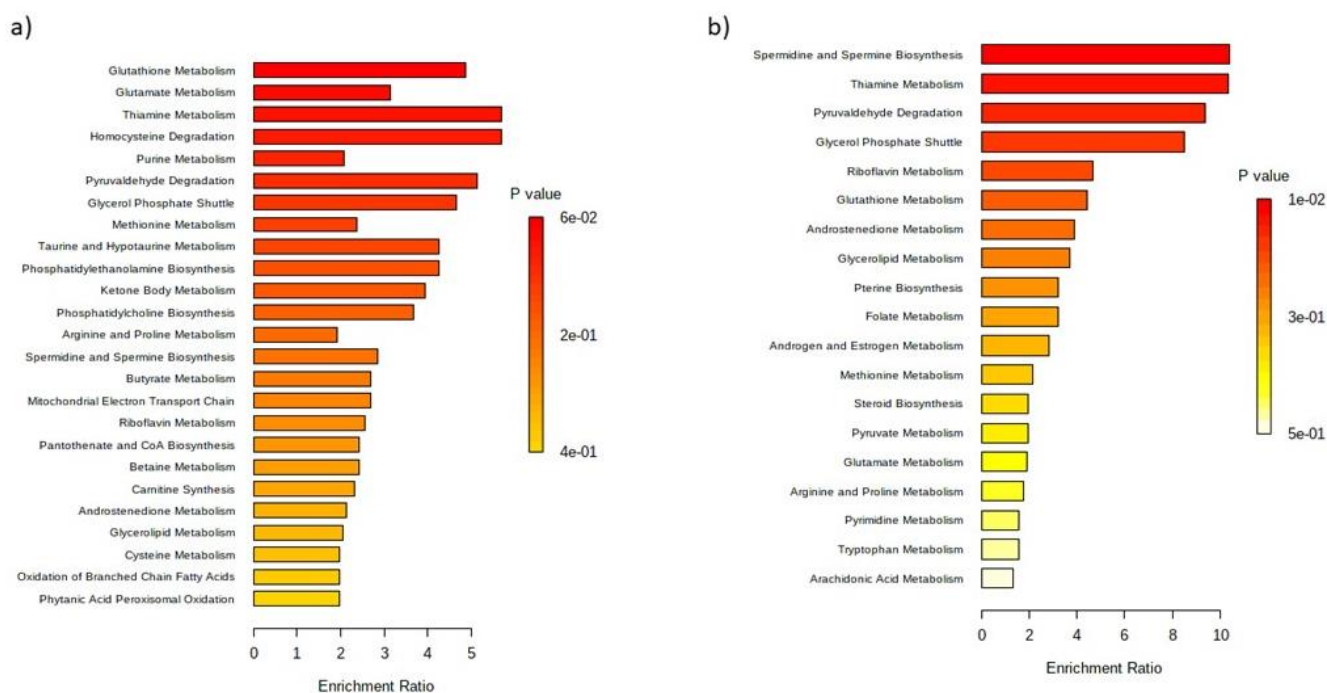


Figura 22 - Vias metabólicas afetadas pelos compostos propostos, do modo positivo, na presença ou ausência de Aramé, para as células Caco-2 (a) e Hep-G2 (b). Obtidas pelo *MetaboAnalyst 5.0 Pathway Enrichment* – análise de metabolitos significativamente diferentes entre grupos ($p < 0,05$). A taxa de enriquecimento é calculada como o número de *hits* entre uma via metabólica particular a dividir pelo número de *hits* expectável.

Como se pode constatar no geral, as vias metabólicas mais afetadas em ambos os tipos de células, quando expostas ao extrato de Aramé, são: as vias metabólicas do metabolismo de lípidos, fosfolípidos e ácidos gordos; do metabolismo de aminoácidos; vias associadas a fatores de crescimento e vitaminas; e do metabolismo energético da respiração celular, nomeadamente do catabolismo ou oxidação. Foi ainda notório que alguns metabolitos presentes foram associados à via do metabolismo da glutathiona, um tripéptido de glutamato, cisteína e glicina associado à regulação da atividade redox do organismo, [265] ou vias relacionadas, como o metabolismo da espermidina e espermina que são poliaminas conhecidas por protegerem as células de danos pelas espécies ROS, principalmente, o DNA [266].

Em relação às vias metabólicas alteradas associadas aos aminoácidos, salienta-se que, a via de degradação/ catabolismo do glutamato que é um aminoácido utilizado no metabolismo da glutathiona (GSH), assim como a metionina que é precursor da cisteína, a qual também faz parte do metabolismo da GSH [267]. Nota-se ainda a alteração da

via de degradação da homocisteína faz parte de grande parte da via metabólica da metionina e também demonstrou diminuir o risco de DCVs [268].

Sabe-se também que, a espermina é um metabolito natural que já demonstrou ter a capacidade de proteção contra as DCVs. As análises de metabolómica demonstraram que os problemas no metabolismo da espermina podem levar a uma diminuição dos níveis de espermina, o que é frequentemente observado nas placas de ateromas [266]. Afeta também as vitaminas como é o caso da B1, nas células Caco-2 pode ter sido fornecida pela alga e as células aumentaram a absorção da tiamina, uma vez que, no intestino a quantidade de tiamina costuma ser baixa [269]. Nas células Hep-G2, pode ser que estas células tenham tido um aumento no consumo da tiamina, uma vez que esta costuma acumular-se no fígado [270]

No caso das células Caco-2, na presença do extrato de Aramé apresentou alterações nas vias metabólicas associadas aos aminoácidos, nomeadamente, na taurina, na arginina e na prolina. Nas vias metabólicas associadas à divisão celular como o metabolismo das purinas. E nas vias metabólicas relacionadas com o metabolismo de crescimento, vitaminas e respiração celular. Também afeta vias metabólicas associadas a lípidos de membrana como os fosfolípidos.

Em relação às vias alteradas dos aminoácidos, em particular a taurina, sabe-se que está relacionada com a cisteína, portanto também está relacionado com o metabolismo da GSH.

As vias metabólicas alteradas relacionadas com a divisão celular estão relacionadas com bases azotadas de adenosina, nomeadamente, a SAD e ADS e a base azotada HPX. A HPX é um produto do catabolismo do ATP e a sua acumulação nas células pode significar a inibição do enzima xantina oxidase que é um alvo terapêutico para o tratamento da gota [271].

As vias afetadas dos lípidos de membrana, nomeadamente a PE 16 e PFC, pode indicar que o extrato de Aramé em contacto com as células pode afetar a passagem de determinados compostos pela membrana.

Como se pode observar na figura 27 b), as vias mais afetadas nas células Hep-G2, na presença de extrato de Aramé foram as vias associadas aos lípidos como as hormonas esteróides. Afeta vias relacionadas com os fatores de crescimento e vitaminas, nomeadamente as pirimidinas, vitaminas do complexo B. Afeta também as vias metabólicas de aminoácidos, como o triptofano e as homocisteínas.

As células Hep-G2 apresentam também alterações noutras vias metabólicas, designadamente, o metabolismo de fosfolípidos de membrana. Apresentam também alterações de fatores de crescimento e vitaminas e afeta a via dos aminoácidos.

Salienta-se na via dos fosfolípidos alterações do metabolismo do ácido araquidónico pois, nos *heatmaps* há alterações significativas no 5'-Deoxy-5' [272]. Os fatores de crescimento afetados são o metabolismo das pirimidinas e o metabolismo do folato, uma vez que, que apresenta alterações nos péptidos Phe-Pro e Cys-pro [273]. Por fim, a via dos aminoácidos afetada é o metabolismo do triptofano pois, há alterações no Quin [275].

- **Nori**

Para o extrato de Nori efetuou-se o mesmo tipo de análise que foi feita para o extrato de Aramé. Os gráficos PLS, Volcano, PCA e $\log_2(\text{fold change})$ estão representados no anexo 3.3.2, tanto para o modo negativo como para o modo positivo, para as células Caco-2 e Hep-G2.

Nas Figuras 23 e 24, encontram-se os *heatmaps* obtidos para o extrato de Nori. Novamente, os compostos a verde correspondem aos metabolitos mais abundantes ou a vermelho os menos abundantes encontrados nas células controlo e células tratadas.

Compostos propostos modo positivo	Caco-2	Caco-2+Nori
ϵ -Caprolactama (ϵ -C)	269131	466393
Cys-Pro	1408	2983
(1,4-dimetil-4-propil-heptil)-(2-metilbutil)amina (DPHMA)	464590	138209
Acetilcolina (Ach)	2461	41993
6-(etilíio)-1-(2-hidroxi-etoximetil)-5-metil-pirimidina-2,4-quinona (Quinona)	914	11619
Fenacilamina (FCN)	37263	339
Aplidiasfingosina (AFG)	2269	7509
(1S,2R)-1-[3-(metilíio)-1H-pirazol-5-yl]propano-1,2,3-triol (Triol)	1362	4270
Dibenzil-[4-(3,7-ditert-butil-4H-diazepin-5-il)fenil]amina (DINA)	65	40627
Ácido propiónico 3-[7-[4-(2-acetamido-4-metil-tiazol-5-il)sulfonilpiperazino]-5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-6-il]etil ester (Prop)	2997	5660
Amida Palmítica (AP)	29569	47171
Oleamida (OEA)	64986	100476

Compostos propostos modo negativo	Caco-2	Caco-2+Nori
2-ceto-N-[β -(4-neopentilpiperazino)-3-piridil]-2-(2-fenil-5,6,7,8-tetra-hidroindolizín-3-il)acetamida (CMIDA)	391	84212
(1S)-N-(4-Etilciclohexil)-2-[(metilíio)oxiperoximetil]ciclopropanocarboxamida (CPCD)	1379	4551
Ácido 2-Dodecílbenzenesulfónico (2-D)	147569	78783
Ácido 2-Hidroxidodecanoico (HD)	795	7516
Ácido Undecanodioico (AU)	5051	27136
Ácido 2-hidroxi-10-undecanóico (AHU)	175	4316
1-[1-(2-Dodecoxi-etoxi)etoxi]etil hidrogenossulfato (DEHS)	48491	21639
2-[3-[3-[3-(3-Octoxipropoxi)propoxi]propoxi]propoxi]etil hidrogenossulfato (OPEHS)	17235	7703
2-[2-[2-(Di-hexilamino)-2-ceto-etoxi]etoxi]-N,N-di-hexil-acetamida (DMIDA)	1237	2864
Inosina (I)	116822	55795

Figura 23 - Heatmap dos compostos propostos que variam na presença ou ausência de Nori, nas células Caco-2 (a) modo positivo e (b) modo negativo, com base nas intensidades médias, com intervalo de confiança de 95 %.

a

Compostos propostos modo positivo	Hep-G2	Hep-G2 + Nori
Amida Palmítica (AP)	30011	72723
fosfatidiletanolamina (PE 16)	30109	11067
Benzilpeniciloil-cisteína (BPO-cys)	49783	13595
1-(9Z-Octadecenil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (PE 18)	41442	13941
Glutaciona, oxidada (GSSG)	40801	103646
1-Palmitoilfosfatidilcolina (PFC)	40748	13457
Glutaciona (GSH)	94977	37910
Tiamina (B1)	9766	3276
Hipoxantina (HPX)	38822	91185

b

Compostos propostos modo negativo	Hep-G2	Hep-G2 + Nori
PS(16:0/0:0) (PS 16)	4817	237
Alisina (A)	1619	231
PS(18:1(9Z)/0:0) (PS 18)	4618	299
Ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico (5-H)	153368	17993
1-(2-Metoxi-octadecanil)-sn-glicero-3-fosfoserina (MFOSF)	29183	3217
Ácido 2-Hidroxidodecanoico (HD)	5908	841
Ácido 2-Dodecilbenzenesulfônico (2-D)	148603	9411
Coenzima A (CoA)	16957	658
Ácido Succínico (AS)	67234	19500
Ácido Metoxiacético (AcM)	220337	45156

Figura 24 - Heatmap dos compostos propostos que variam na presença ou ausência de Nori, nas células Hep-G2, (a) modo positivo e (b) modo negativo, com base nas intensidades médias, com intervalo de confiança de 95 %.

Tal como foi estudado para o extrato de Aramé, para o extrato de Nori também foi efetuada uma análise das vias metabólicas que poderiam estar associadas aos metabolitos alterados, recorrendo à plataforma Metaboanalyst, Figura 25.

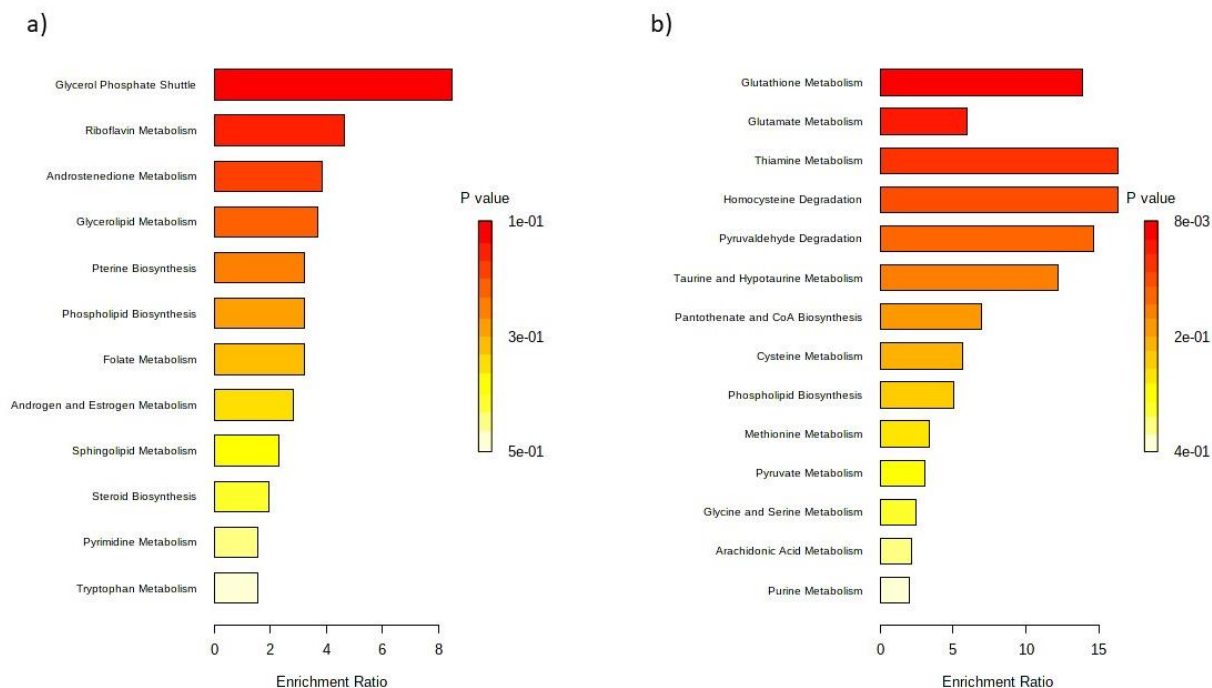


Figura 25 - Vias metabólicas afetadas pelos compostos propostos na presença ou ausência de Nori, para as células Caco-2 (a) e Hep-G2 (b), no modo positivo. Obtidas pelo *MetaboAnalyst 5.0 Pathway Enrichment* – análise de metabolitos significativamente diferentes entre grupos ($p < 0,05$). A taxa de enriquecimento é calculada como o número de *hits* entre uma via metabólica particular a dividir pelo número de *hits* expectável.

Pela análise da figura 25, pode-se concluir que no geral, na presença de Nori, as vias metabólicas mais afetadas, em ambos os tipos de células, são bastante distintas tendo apenas em comum a via dos lípidos, fosfolípidos e ácidos gordos que estão relacionados com a membrana celular e, por isso, podem afetar a passagem de compostos para o interior da célula. Podendo, assim, afetar a passagem de colesterol na membrana celular, servindo para prevenir/tratar a hipercolesterolemia [268]. No *heatmaps*, pode-se observar alterações na AFG, PE-18, PFC, PE16, AP e OEA que justifiquem as alterações nesta via.

No caso das células Caco-2, as vias metabólicas afetadas são os fatores de crescimento, a via dos aminoácidos e vias da respiração celular.

Os fatores de crescimento e vitaminas afetados são o metabolismo das pirimidinas e o metabolismo do folato, uma vez que, que apresenta alterações nos péptidos Phe-Pro e Cys-pro [273] e o metabolismo da riboflavina com alterações na DPHMA [274]. A via dos aminoácidos afetada é o metabolismo do triptofano pois, há alterações no Quinona [274]. A via da respiração celular é o metabolismo de piruvatos pois, há alteração na ACh [276].

Por fim, para as células Hep-G2, as vias metabólicas mais afetadas são: o metabolismo da glutatona que é muito importante na proteção celular contra os danos das ROS, a via dos aminoácidos e a via dos fatores de crescimento e vitaminas.

Em relação às vias metabólicas alteradas salienta-se que, a via de degradação/catabolismo do glutamato que é um aminoácido utilizado no metabolismo da GSH, assim como a metionina que é precursor da cisteína, a qual também faz parte do metabolismo da GSH e os aminoácidos da taurina e da hipotaurina dos quais a glutatona é precursora [277]. Nota-se ainda a alteração da via de degradação da homocisteína faz parte de grande parte da via metabólica da metionina e também demonstrou diminuir o risco de DCVs [267, 268].

As vias de fatores de crescimento e vitaminas alteradas são o metabolismo das purinas devido a alterações na B1, HPX e do metabolismo do aminoácido serina [278], a biossíntese de pantotenato e CoA pois, esta associada às alterações na BPO-cys [279]. No caso da B1, nota-se que o extrato de Nori pode ter levado a que as células tenham tido um aumento no consumo da tiamina, uma vez que a B1 costuma acumular-se no fígado [271].

- **Fucus**

Para o extrato de Fucus também se efetuou o mesmo tipo de análise que foi feita tanto para o extrato de Aramé como para o extrato de Nori. Os gráficos PLS, Volcano, PCA e $\log_2(\text{fold change})$ estão representados no anexo 3.3.3, tanto para o modo negativo como para o modo positivo, para as células Caco-2 e Hep-G2.

Nas Figuras 26 e 27, encontram-se os *heatmaps* obtidos para o extrato de Fucus. Novamente, os compostos a verde correspondem aos metabolitos mais abundantes ou a vermelho os menos abundantes encontrados nas células controlo e células tratadas. Os compostos representados nos *heatmaps* são aqueles que mais variaram nas duas situações estudadas, para os dois tipos de células.

Composto proposto modo positivo	Caco-2	Caco-2+Fucus
3-amino-2,3-dideoxi-ribose (ADSI)	23139	7130
N-Propionimetionina (NPF)	10009	2173
Glu Phe	9248	2893
Esfingosina (FS)	2443	11230
(1,4-dimetil-4-propil-heptil)-(2-metilbutil)amina (DPHMA)	39190	71242
1-(8Z-Octadecenil)-sn-glicero-3-Fosfoetanolamina (PE 18)	6476	19491
1-Palmitoilfosfatidilcolina (PFC)	21165	154588
1-Tetradecil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina (TAGF)	6238	43308
Ácido carboxílico (2R,4S)-2-[(1R)-2-[(2-amino-2-carboxietil)disulfanil]-1-carboxietilamino]-2-ceto-1-[(2-fenilacetil)amino]etil-5,5-dimetil-iazolidina-4 (Carb)	20821	1216
Fosfatidiletanolamina (PE 16)	4838	24080
Inosina (I)	11806	4310
2-Metilbutilcarnitina (MBC)	12021	19784
Monofosfato de adenosina (AMP)	10688	20397
Glutationa (GSH)	2345	214862
Benzilpenicilil-cisteína (BPC-O ₂ S)	19376	81072
Ácido (2S)-2-[[2-[(2S)-2-[[[(2S)-1-[(2S)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-2-amino-3-(4-hidroxi-fenil)propanoil]amino]-4-metil-pentanoil]amino]propanoil]propanoil]amino]propanoil]amino]-3-(1H-imidazol-5-il)propanoil]amino]acetil]amino]-3-metil-butíric (AcB)	10298	25358
Ácido Hexadecénico (Hexa)	3620	6495
Espermidina (Espd)	43473	13348
L-Valina (Val)	18518	36875
Adenosina (AD)	2411	61
1-[5-(benzotio)-1,3,4-tiadiazol-2-il]-5-(3,4-dietoxifenil)-4-[2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-5-il]hidroximetileno]pirrolidina-2,3-quinona (Quin)	41930	378

a

b

Compostos propostos modo negativo	Caco-2	Caco-2+Fucus
Gamma-Glu-Leu (Y-Glu-Leu)	15268	2543
4-[bis(2-Cianoetil)sulfamoil]-N-(6-metil-1,3-benzotiazol-2-yl)-N-(E)-(5-nitro-2-fenil)metileneamino]benzamida (Benz)	3284	10552
Glutationa (GSH)	1121	55644
C75 trans (C75)	6569	2889
2-E-Hexenediolcarnitina (2E-H)	1710	788
lisofosfatidiletanolamina (LFOSF)	1697	7086
Ácido Metxiacetilico (AcM)	241794	128251
1-(2-Metoxi-octadecanil)-sn-glicero-3-fosfoerina (MFOSF)	2853	14594
L-Fenilalanina (Phe)	46300	24846
2-Acetil-1H-benzotriazolimidazole-4,9-quinona (Q)	526	4957
Ácido Undecanodiolico (AU)	2258	5225

Figura 26 - Heatmap dos compostos propostos que variam na presença ou ausência de Fucus, nas células Caco-2, (a) modo positivo e (b) modo negativo, com base nas intensidades médias, com intervalo de confiança de 95 %.

a

Compostos propostos modo positivo	Hep-G2	Hep-G2+Fucus
Monofosfato de guanosina (GMP)	3159	16696
Ácido (2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-1-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-amino-3-(4-hidroxifenil)propanoil]amino]-4-metil-pentanoil]amino]propanoil]proil]proil]amino]propanoil]amino]-3-(1H-imidazol-5-il)propanoil]amino]acetil]amino]-3-metil-butíric (AcB)	11499	2895
ε-Caprolactama (ε-C)	59986	115 1924
Adenosuccinato (ADS)	493	9571
Phe Glu	2240	4284
Ácido succínico O4-[4-[[E]-2-(3-hidroxi-5-metil-fenilvinil]fenil] ester O1-(2-keto-3,5,5-trimetil-4-vinil-ciclohex-3-en-1-il) ester (O4)	14003	685
Apilidiasfingosina (AFG)	8802	3238
Inosina (I)	4303	26952
Colina (CO)	6513	18793
Monofosfato de adenosina (AMP)	96440	278920
Fosfocolina (FCO)	2321	5036
Esperrina (Esp)	4918	1621
Adenosina (AD)	13607	70938
ácido oftálmico (OFT)	3911	6942

b

Compostos propostos modo negativo	Hep-G2	Hep-G2 + Fucus
C75 trans (C75)	46536	8302
Ácido 2-Hidroxidodecanoico (HD)	4540	342
Trifosfato de adenosina (ATP)	40591	7752
2E-Hexenedioilcarnitina (2E-H)	19270	2743
Monofosfato de Uridina (UMP)	10013	36389
Ácido 3-Hidroxi-3-metil-Glutárico (AHG)	25641	14077
N-Acetil-DL-metionina (AMET)	1234	3603
ADP-ribose cíclico (ADP-R)	15550	2388
1-(3-Etilsulfinilciclohexil)-2-metil-3-[2-[[5-metil-2-thienil]sulfonilamino]ethyl]guanidina (G)	1964	4097

Figura 27 - Heatmap dos compostos propostos que variam na presença ou ausência de Fucus, nas células Hep-G2, (a) modo positivo e (b) modo negativo com base nas intensidades médias, com intervalo de confiança de 95 %.

Tal como foi estudado para o extrato de Aramé e para o extrato de Nori, para o extrato de Fucus também foi efetuada uma análise das vias metabólicas que poderiam estar associadas aos metabolitos alterados, recorrendo à plataforma Metaboanalyst, Figura 28.

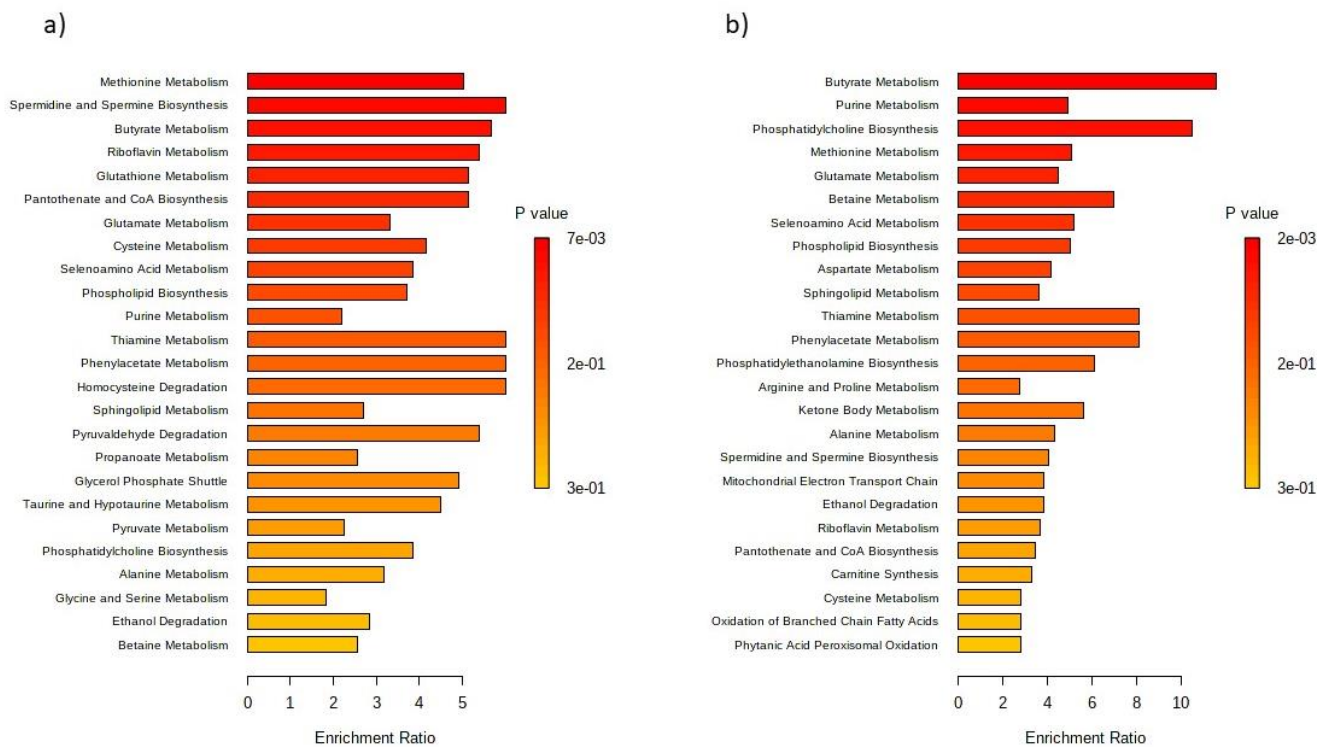


Figura 28 - Vias metabólicas afetadas pelos compostos propostos na presença ou ausência de *Fucus*, para as células Caco-2 (a) e Hep-G2 (b). Obtidas pelo *MetaboAnalyst 5.0 Pathway Enrichment* – análise de metabolitos significativamente diferentes entre grupos ($p < 0,05$). A taxa de enriquecimento é calculada como o número de *hits* entre uma via metabólica particular a dividir pelo número de *hits* expectável.

Pela análise da figura 28, nota-se que o *Fucus* influencia uma quantidade considerável de vias metabólicas, tanto nas células Caco-2 como nas Hep-G2, estas vias afetadas em ambas as células são: a via dos aminoácidos, vias de fatores de crescimento e vitaminas, e via dos lípidos e fosfolípidos.

Afeta as vias dos fatores de crescimento e vitamínicos, nomeadamente, a biossíntese espermidina e espermina e problemas no seu metabolismo podem levar a uma diminuição dos níveis de espermina, o que é frequentemente observado nas placas de ateromas [266], metabolismo da riboflavina com alterações na DPHMA e metabolismo da tiamina devido a alterações no metabolismo da cisteína, BPO-cys [280]; biossíntese de pantotenato e CoA pois, esta associada às alterações na BPO-cys [279] e metabolismo da betaína que é um aminoácido que está envolvido na síntese da carnitina, levando a alterações do MBC [281, 268].

Também influencia os lípidos, tal como a biossíntese de fosfolípidos que afetar a passagem de compostos para o interior da célula, nomeadamente, a AFG, PE 18, PFC, TAGF, PE 16 e FCO e ácidos gordos de cadeia curta como AcE e AcB.

Para as células Caco-2, as vias metabólicas mais afetadas são: o metabolismo da glutatona que é importante para a proteção celular e, conseqüentemente, as vias dos aminoácidos como a degradação/ catabolismo do glutamato que é um aminoácido utilizado no metabolismo da GSH, assim como a metionina que é precursor da cisteína, a qual também faz parte do metabolismo da GSH [267] e os aminoácidos da taurina e da hipotaurina dos quais a glutatona é precursora [277] e a degradação da homocisteína faz parte de grande parte da via metabólica da metionina e também demonstrou diminuir o risco de DCVs [268].

Para as células Hep-G2, a via metabólica mais afetada é: a via dos aminoácidos, tais como o metabolismo do aspartato, o metabolismo da arginina e prolina que estão associados a alterações no O4, envolvido no ciclo do ácido cítrico [282].

4.4. Estudo da ação dos extratos das algas sobre as proteínas celulares

4.4.1. Proteoma total das células Caco-2 e Hep-G2

4.4.1.1. Caco-2

Com o objetivo de avaliar o efeito dos extratos de algas marinhas sobre as proteínas celulares, foi efetuada uma extração das proteínas das células Caco-2 em contacto com os extratos de Aramé, Nori e Fucus e das proteínas de células Caco-2 controlo. De seguida efetuou-se uma eletroforese SDS-PAGE com o objetivo de determinar diferenças entre as proteínas em contacto com o extrato e as proteínas das células controlo. A figura 29 representa o gel SDS-PAGE obtido com proteínas das células Caco-2.

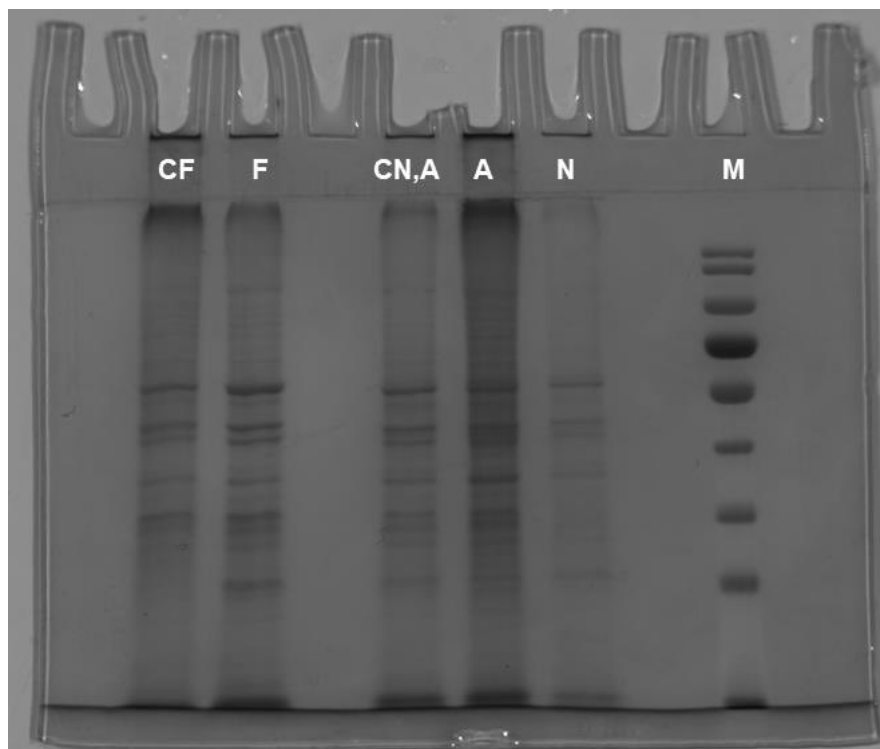


Figura 29 - Gel de SDS-PAGE obtido com proteínas de células Caco-2, nas seguintes condições: (CF) controle de Fucus; (F) Fucus; (CN,A) Controle de Aramé e Nori; (A) Aramé; (N) Nori; e (M) marcador *PageRuler Prestained Protein Ladder*.

Após a análise da figura 29 utilizando um software de análise de imagem, o *ImageJ* foram quantificadas as intensidades das bandas de proteínas obtidas, pelo cálculo das áreas normalizadas pelo perfil total de proteínas obtidas em cada amostra que se encontram no anexo 3.5.1. Das áreas obtidas selecionaram-se as bandas das proteínas que mais diferiam entre as células tratadas e as células controle (pelo menos 2x maior intensidade), e, para estas proteínas foi calculado o peso molecular com base na curva de calibração do marcador (M). Na tabela 1, encontram-se os pesos moleculares determinados para as proteínas que mais diferiram entre as células tratadas com extrato de alga e controle.

Tabela 1 - Peso molecular (MW) das proteínas que se destacaram 2x mais na presença do extrato de Aramé, Nori e Fucus, nas células Caco-2.

Proteínas alteradas (kDa)		
Aramé	Nori	Fucus
186,62	185,78	189,16
80,68	118,36	153,04
	108,64	
57,53	50,71	130,7
	46,76	
50,25	44,69	107,67

Em todas as células em contacto com os extratos de algas, é de salientar uma proteína que se destacou, com peso molecular aproximadamente de **180** kDa, semelhante à massa molecular da proteína transportadora do colesterol NPC1L1 [283] o que pode indicar que, na presença dos extratos, a proteína NPC1L1 sofreu alguma modificação na sua expressão. A proteína NPC1L1 tem uma massa molecular ~145 kDa, no entanto é referida na literatura como sendo glicosilada e podendo surgir em várias bandas a partir desta massa molecular [283].

Na presença do extrato de Aramé, destacou-se também uma alteração na quantidade de uma proteína com aproximadamente **73** kDa, que é aproximadamente a massa molecular das proteínas transportadoras ABC do colesterol ABCG8/G5. Uma análise por *Western Blotting* em 4.4.3. foi executada de modo a avaliar estas modificações.

4.4.1.2. Hep-G2

Da mesma forma que se fez para as células Caco-2, para as células Hep-G2 avaliou-se o efeito dos extratos de algas marinhas sobre os transportadores de colesterol NPC1L1 e os transportadores ABC, e para isso foi efetuada uma extração das proteínas das células Hep-G2 em contacto com os extratos de Aramé, Nori e Fucus e das proteínas de células Hep-G2 controlo. Deste modo, efetuou-se uma eletroforese SDS-PAGE com o objetivo de determinar diferenças entre as proteínas em contacto com o extrato e as proteínas controlo. A figura 30 representa o gel SDS-PAGE obtido com proteínas das células Hep-G2.

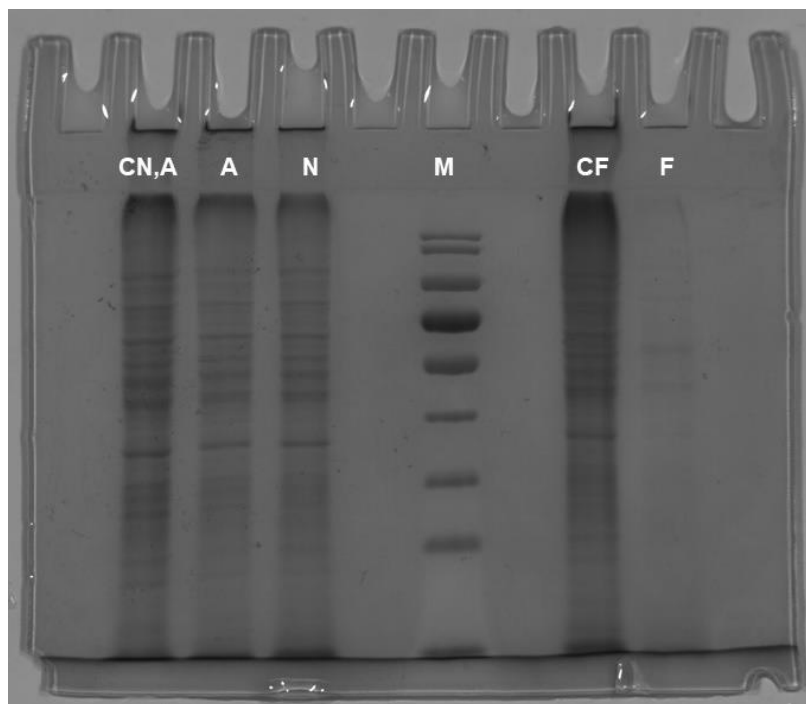


Figura 30 - Gel de SDS-PAGE obtido com proteínas de células Hep-G2, nas seguintes condições: (CN,A) controlo de Aramé e Nori; (A) Aramé; (N) Nori; (M) marcador *PageRuler Prestained Protein Ladder*; (CF) controlo Fucus; e (F) Fucus.

As áreas e os perfis obtidos para cada uma das bandas de proteínas encontram-se no anexo 3.5.2. e, mais uma vez, foi calculado o peso molecular das proteínas que tinham maiores diferenças (2x maior intensidade) nas áreas. Na tabela 2, encontram-se os pesos moleculares determinados.

Tabela 2 - Peso molecular das proteínas em contacto com os extratos de Aramé, Nori e Fucus que diferiam 2x mais, nas células Hep-G2.

Proteínas alteradas (kDa)		
Aramé	Nori	Fucus
184,23	145,05	177,77
163,18		127,57
78,52	96,23	92,19
		50,44
42,2	52,27	50,26
		34,68

Nas células Hep-G2, destacam-se proteínas na zona dos 140 - 180 kDa que podem indicar alterações na expressão da NPC1L1. No caso da Aramé (A), também há uma proteína na zona dos 78 kDa que pode pertencer a um dos transportadores ABC. Estas duas suposições podem ser confirmadas pelo *Western Blotting*.

4.4.2. Proteínas transportadores do colesterol NPC1L1 e ABCG5

De modo a confirmar se as proteínas identificadas no ponto anterior correspondem aos transportadores NPC1L1 e ABC, foi efetuada uma análise *Western Blotting*. Para o *Western Blotting* foram usados dois anticorpos primários para identificar os transportadores NPC1L1 e ABCG5 pois, como foi referido anteriormente, ambos são expressos nas células Caco-2 e Hep-G2. No anexo 3.6., encontram-se as áreas das bandas e os respetivos perfis obtidos após a utilização do software *ImageJ* que permitiu calcular diferenças na quantidade de proteínas por banda.

4.4.2.1. Efeito sobre o transportador NPC1L1

Na figura 31, encontra-se os resultados obtidos para o efeito dos extratos de Aramé, Nori e Fucus sobre o transportador NPC1L1, tanto para as células Caco-2 como para as células Hep-G2. A figura apresenta as bandas das proteínas NPC1L1 detetadas após incubação da membrana (na região do marcador (M) entre 10 e 180 kDa) com o respetivo anticorpo.

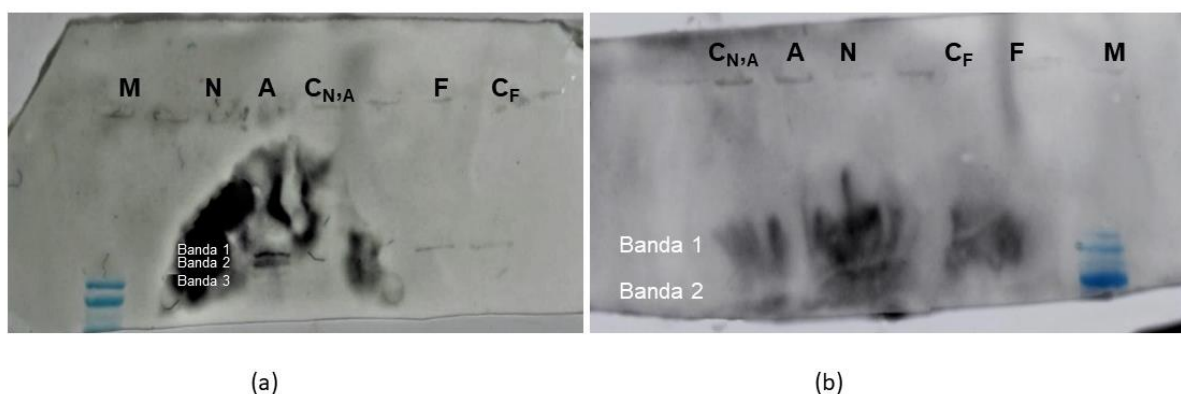


Figura 31 - Membranas da proteína NPC1L1 para células Caco-2 (a) e células Hep-G2 (b). Onde C_F é o controlo de Fucus, F é o Fucus, C_{N,A} é o controlo de Aramé e Nori, A é Aramé, N é Nori e M é o marcador.

Nas figuras 32 e 33, encontram-se as áreas normalizadas, das bandas identificadas na figura 31, representadas pelas áreas normalizadas. Através destas figuras pode-se observar as diferenças na expressão da proteína NPC1L1 para as células Caco-2 e Hep-G2 em contacto com os extratos das algas por comparação com as áreas obtidas nas células controlo.

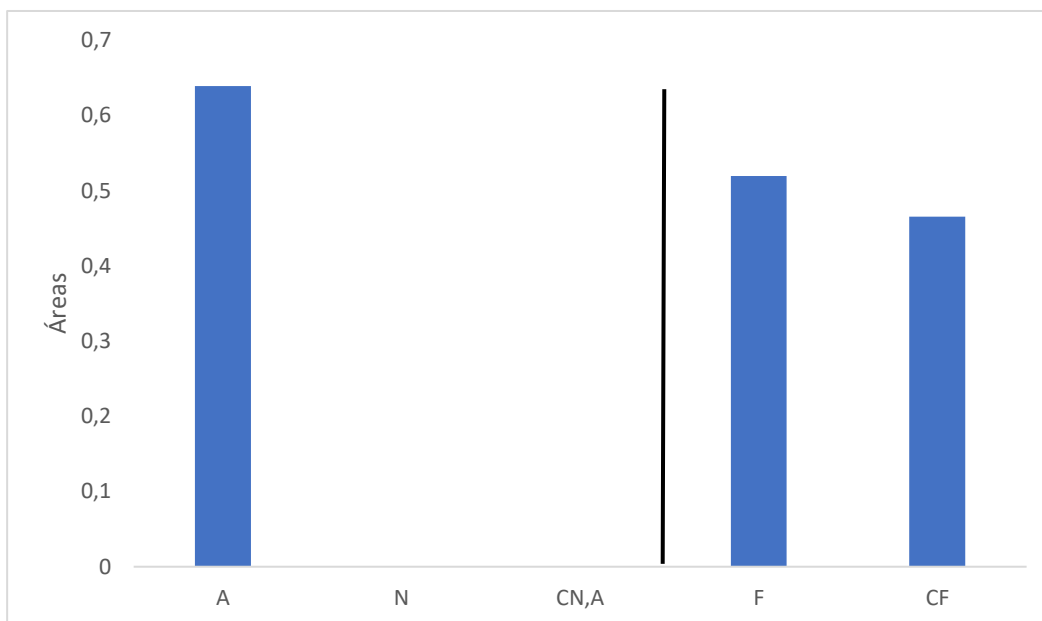


Figura 32 - Áreas normalizadas das bandas da proteína NPC1L1, para as células Caco-2. Onde C_F é o controlo de Fucus, F é o Fucus, $C_{N,A}$ é o controlo de Aramé e Nori, A é Aramé e N é Nori.

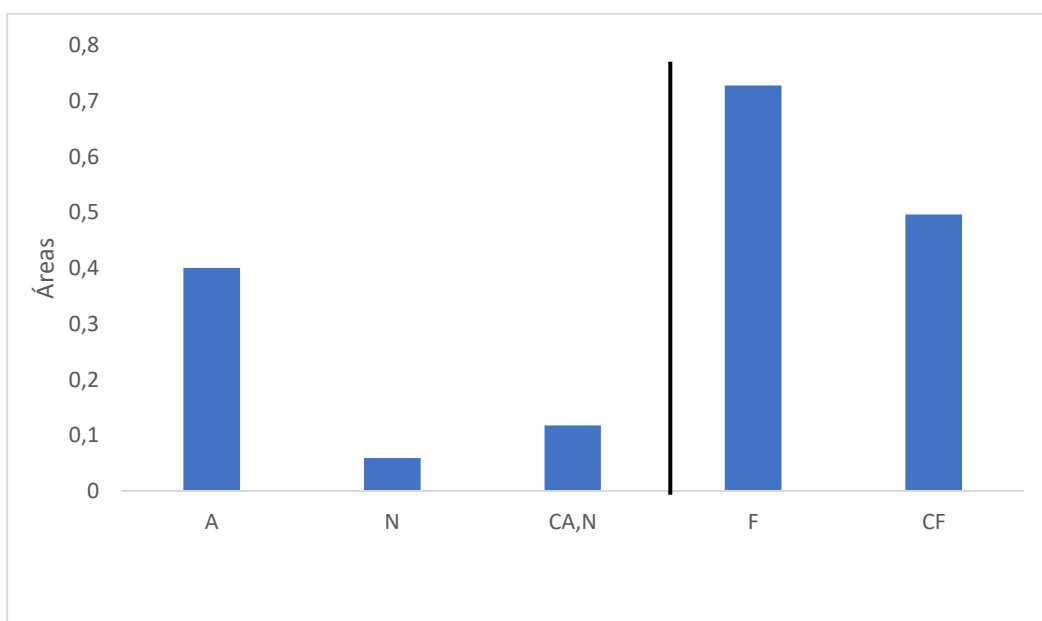


Figura 33 - Áreas normalizadas das bandas da proteína NPC1L1, para as células Hep-G2. Onde C_F é o controlo de Fucus, F é o Fucus, $C_{N,A}$ é o controlo de Aramé e Nori, A é Aramé e N é Nori.

Como foi referido anteriormente, para as células Caco-2 (Figura 32), em contacto com o extrato de Fucus, conclui-se que, houve um aumento na expressão da proteína transportadora NPC1L1, porque foram detetadas diferenças nas intensidades da banda 1 nas células controlo (C_F) relativamente às células tratadas (F).

Para as células em contacto com o extrato de Aramé (A) não é possível retirar conclusões em relação à expressão do NPC1L1 relativamente ao controlo (CN,A), pois

não se quantificou a referida proteína, talvez por baixa taxa de expressão uma vez que é uma proteína pouco expressa nas células do cólon (Caco-2) [249]. Os resultados para o extrato de Nori (N) foram inconclusivos.

Estes resultados ainda podem ser comparados com os resultados do ponto 4.3.1, na interferência dos extratos das algas na permeação do colesterol na barreira gastrointestinal. Verificou-se que o extrato de Fucus promoveu a expressão da NPC1L1, no entanto ocorreu, na presença deste extrato, uma redução na absorção de colesterol. Tal como referido os compostos bioativos do Fucus podem ligar-se a esta proteína para permear a membrana da barreira gastrointestinal e competem com a passagem do colesterol, levando a uma diminuição da absorção de colesterol. Em relação à Aramé e à Nori, não se retiraram conclusões sobre a taxa de expressão da NPC1L1 entre o controlo e as células em contato com a alga. Então, a redução da permeação do colesterol poderá não estar diretamente ligada a esta proteína.

Para as células Hep-G2, a NPC1L1 foi encontrada em todas as amostras aplicadas. Para o extrato de Fucus, nota-se que há um aumento da expressão do NPC1L1 entre as células tratadas (F) e as células controlo (CF), então, a alga aumenta o transporte reverso do colesterol. Para o extrato de Nori (N) e o respetivo controlo (CN,A), existe uma diminuição da expressão deste transportador.

No caso do extrato de Aramé, nota-se que existem diferenças significativas entre o transportador das células controlo (CN,A) e das células tratadas (A), o que indica que esta alga tem a capacidade de alterar a expressão desta proteína, podendo influenciar a passagem do colesterol no fígado, isto é, o aumento do NPC1L1 pode significar o aumento da recirculação do colesterol para ser eliminado no fígado na via do transporte reverso do colesterol.

Comparando os resultados obtidos para as células Caco-2 e Hep-G2, nota-se que as células Hep-G2 apresentam uma quantidade muito maior da proteína NPC1L1. Estes resultados vão de acordo com a literatura [284] pois, segundo os autores as células HepG2 produzem mais proteína NPC1L1 do que as células Caco-2.

4.4.2.2. Efeito sobre o transportador ABCG5

Na figura 33, encontra-se os resultados obtidos para o efeito dos extratos de Aramé, Nori e Fucus sobre o transportador ABCG5, tanto para as células Caco-2 como para as células Hep-G2. A figura apresenta as bandas da proteína ABCG5 detetadas após

incubação da membrana (na região do marcador (M) entre 10 e 180 kDa) com o respectivo anticorpo.

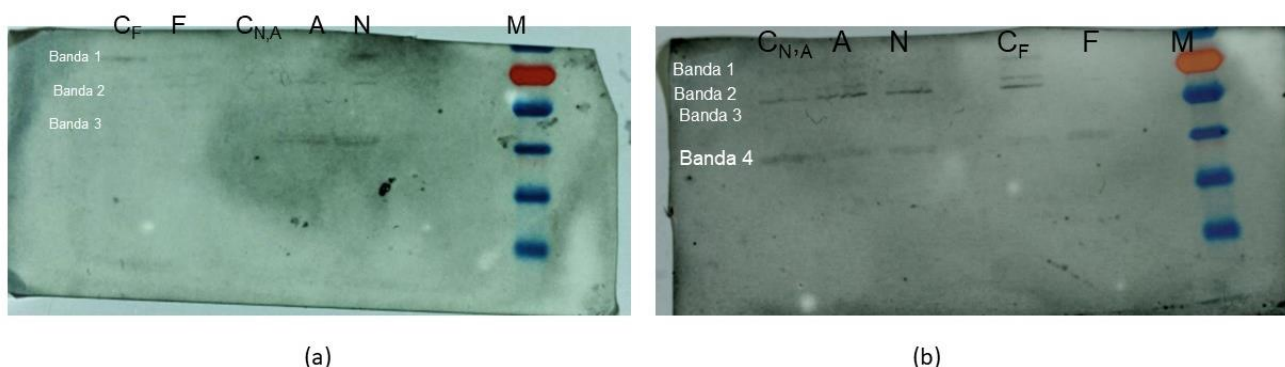


Figura 34 - Membranas da proteína ABCG5 para células Caco-2 (a) e células Hep-G2 (b). Onde C_F é o controlo de Fucus, F é o Fucus, C_{N,A} é o controlo de Aramé e Nori, A é Aramé, N é Nori e M é o marcador.

Nas figuras 35 e 36, encontram-se representadas as intensidades das bandas identificadas na figura 34, representadas pelas áreas normalizadas. Através destas figuras pode-se observar as diferenças na expressão da proteína ABCG5 para as células Caco-2 e Hep-G2 em contacto com os extratos de algas por comparação com as áreas obtidas nas células controlo.

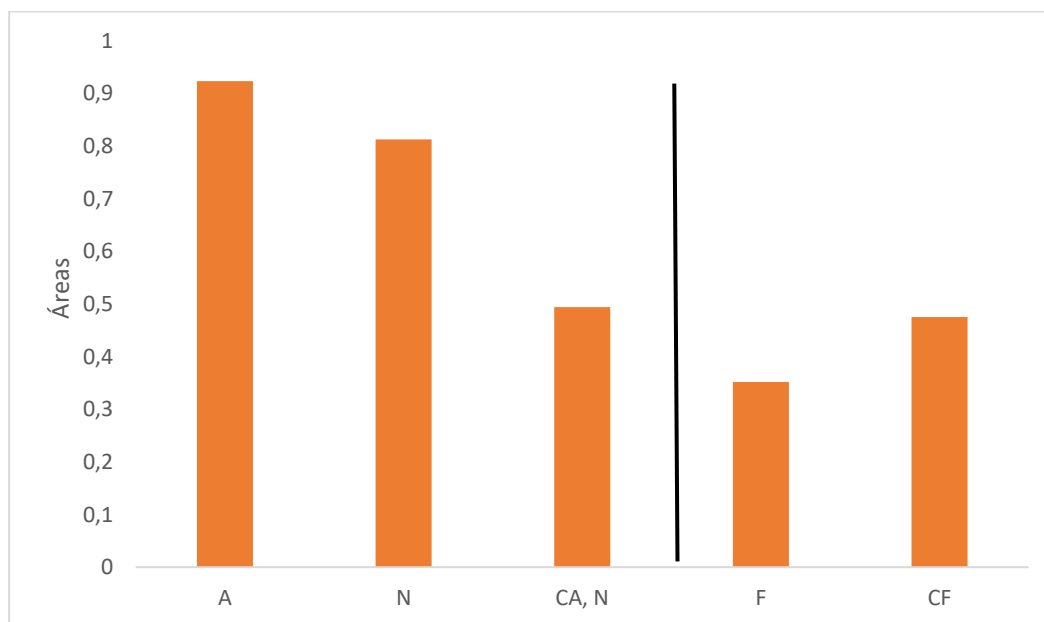


Figura 35 - Áreas normalizadas das bandas da proteína ABCG5, para as células Caco-2. Onde C_F é o controlo de Fucus, F é o Fucus, C_{N,A} é o controlo de Aramé e Nori, A é Aramé e N é Nori.

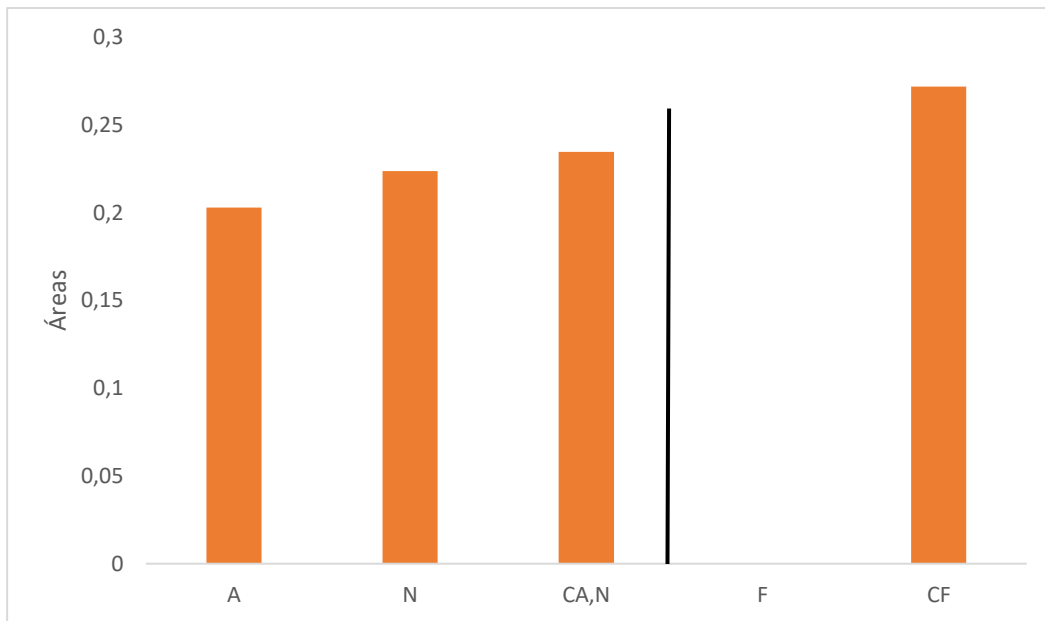


Figura 36 - Áreas normalizadas das bandas da proteína ABCG5, para as células Hep-G2. Onde C_F é o controlo de Fucus, F é o Fucus, $C_{N,A}$ é o controlo de Aramé e Nori, A é Aramé e N é Nori.

Como foi referido anteriormente, para as células Caco-2 (figura 35), em contacto com o extrato de Fucus, conclui-se que houve uma diminuição na expressão do transportador ABCG5 pois, foram detetadas diferenças nas intensidades da banda 2 nas células controlo (CF) e as células tratadas (F).

Para as células em contacto com o extrato de Aramé (A) e o extrato de Nori (N) foi detetada uma maior expressão do transportador ABCG5 relativamente ao controlo (CN,A). Estes dois extratos de algas apresentaram maior intensidade da banda 2 relativamente ao controlo. Pode-se concluir, então, que estes extratos têm a capacidade de alterar a expressão desta proteína, pelo com o aumento da expressão do ABCG5 há a diminuição da absorção do colesterol.

Para as células Hep-G2, esta proteína foi encontrada em todas as amostras aplicadas. No caso do extrato de Fucus, nota-se que para as células tratadas (F) relativamente as células controlo (CF) houve uma modificação deste transportador pois, a banda 2 apresentou menor intensidade. No caso do extrato de Nori, também se verificou uma alteração na expressão deste transportador porque a banda 2 tem menor intensidade nas células tratadas (N) em comparação com as células controlo (CN,A). Portanto, para estes dois extratos há uma diminuição da expressão do transportador ABCG5 levando à diminuição da absorção de colesterol.

Já o extrato de Aramé, nota-se que há uma diminuição na expressão do transportador, então, este extrato pode influenciar a expressão desta proteína.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

5.1. Conclusões

Devido ao aumento do interesse nas algas, pois os seus compostos bioativos apresentaram diversas propriedades benéficas ao nível da saúde e terem demonstrado potencial de aplicação nas indústrias de alimentos funcionais e nutracêuticos. Neste trabalho estudou-se o potencial terapêutico dos compostos presentes em extratos aquosos de Aramé, Nori e Fucus, principalmente na hipercolesterolemia, um dos principais fatores associados às DCV.

Primeiramente, procedeu-se a uma purificação por SPE. Estes extratos e frações foram caracterizados relativamente à quantidade de fenóis totais, polissacáridos e proteínas na sua constituição e por RP-HPLC-DAD. Com estas quantificações observou-se que houve a perda de muitos compostos ao proceder à purificação por SPE. Também se estudaram algumas atividades biológicas, nomeadamente, atividade antioxidante dos extratos e frações e observa-se que, houve redução do poder antioxidante após a purificação. Então, os extratos foram usados na sua totalidade para os estudos seguintes. Foram avaliadas a atividade inibitória de AChE e da HMGR dos extratos. Para o extrato de Aramé obteve-se o melhor EC_{50} , a concentração responsável por 50 % de atividade antioxidante de 0,174 mg de extrato/mL solução. Os restantes extratos tiveram atividades antioxidantes inferiores a 50 %. Para a atividade inibitória de AChE, observa-se que os extratos apresentam baixa atividade, uma vez que, se obteve resultados inferiores a 50% de inibição. No entanto, o extrato de Nori foi o que apresentou melhores resultados sendo por isso adequado para explorar o seu potencial no tratamento/ prevenção da doença de Alzheimer. Por fim, em relação à atividade inibitória de HMGR, para o extrato de Aramé obteve-se 79 ± 7 % e para os outros dois extratos obteve-se atividades inferiores a 50%. O extrato de Aramé demonstrou ser o mais eficiente no tratamento/prevenção da hipercolesterolemia através da inibição da síntese de novo colesterol.

Procedeu-se também a ensaios em linhas celulares com os extratos de Aramé, Nori e Fucus e salienta-se que estes extratos não apresentaram qualquer citotoxicidade para as linhas celulares Caco-2 e Hep-G2. No entanto, verificou-se pelos estudos do metaboloma das células que os extratos de algas marinhas comestíveis têm um efeito sobre as células dos extratos de algas marinhas comestíveis no metaboloma das células. Em relação ao poder antioxidante notou-se que, para a linha celular Caco-2, houve uma diminuição da GSH nas células tratadas com extratos de Aramé e Nori relativamente às células controlo. No entanto, houve um aumento nas células tratadas

com Fucus. O mesmo se verificou para as células Hep-G2 tratadas com Aramé e Nori. No caso da espermidina e espermina que são compostos que protegem as células de danos pelas ROS e protegem as células contra DCVs, sabe-se que, tanto nas células Caco-2 como nas células Hep-G2, o extrato de Aramé aumentou a concentração destes compostos relativamente às células controlo, enquanto, o extrato de Fucus diminuiu em comparação com as células controlo. A hipoxantina está relacionada com a doença de Alzheimer. O extrato de Aramé demonstrou um aumento deste composto face às células controlo, tanto para as células Hep-G2 como para as células Caco-2. Já o extrato de Fucus só apresentou um aumento da hipoxantina em comparação com as células controlo, nas células Hep-G2. A inosina tem como nucleosídeo a hipoxantina, e apresentou um aumento nas células tratadas com o extrato de Aramé e extrato de Fucus, nas células Caco-2 e Hep-G2, respetivamente. O extrato de Nori e o extrato de Fucus apresentaram uma diminuição deste composto para as células Caco-2. Já para a vitamina B1, houve um aumento deste composto nas células Caco-2 tratadas com o extrato de Aramé, enquanto que, para as células Hep-G2, o extrato de Aramé e o extrato de Nori levaram a uma diminuição deste composto face ao controlo. De forma geral, os lípidos aumentaram em comparação ao controlo, nas células tratadas com o extrato de Fucus, nas duas linhas celulares, enquanto o extrato de Aramé levou a um aumento nas células Hep-G2 e uma diminuição das células Caco-2, podendo afetar a permeação de moléculas na membrana celular. Com estes resultados, pode-se concluir que, o melhor extrato é a Aramé pois, apresenta efeitos contra as espécies ROS e contra as DCVs.

De acordo com o objetivo deste trabalho, estudou-se ainda o potencial terapêutico dos extratos aquosos de algas marinhas comestíveis contra a hipercolesterolemia, verificando-se que todos os extratos têm capacidade de reduzir a permeação do colesterol na barreira gastrointestinal no modelo celular utilizado. Conclui-se ainda que, se o objetivo for a terapia combinada com o fármaco ezetimiba que a melhor opção é o extrato de Fucus ou o extrato de Aramé, uma vez que se verificou que o extrato de Fucus/Aramé em conjunto com a ezetimiba melhoram a redução da permeação do colesterol, comparando com o Fucus/Aramé sozinho. O mesmo não se verifica para o extrato de Nori, podendo indicar que os compostos desta alga têm a capacidade de se ligar ao fármaco, havendo interações dos compostos do alimento com o fármaco.

Podendo-se ainda concluir que, os compostos bioativos dos extratos de Aramé, Nori e Fucus permeiam também a barreira gastrointestinal, notando-se, no entanto que, todos os extratos têm menor permeação na barreira gastrointestinal na presença do fármaco ezetimiba, o que sugere a referida interação ou competição dos compostos com o NPC1L1 bloqueado.

Procedeu-se ainda a uma análise de *Western Blotting* para relacionar as alterações na permeação do colesterol na barreira gastrointestinal nas células Caco-2, com efeito sobre as proteínas transportadoras de colesterol o NPC1L1 e o transportador ABCG5. Para as células Caco-2, apenas o extrato de Fucus provocou um aumento da expressão para o transportador NPC1L1 relativamente às células controlo, o extrato promove alterações da taxa de expressão deste transportador, levando a uma diminuição da permeação do colesterol. Para o transportador ABCG5, a linha celular Caco-2, apresenta diferenças tanto na presença do extrato de Aramé como no extrato de Nori, então, pode-se concluir que estes dois extratos, têm a capacidade de alterar a expressão desta proteína, aumentando a excreção de colesterol intestinal.

No caso de efeito sobre o fígado, para a linha celular Hep-G2, o extrato de Aramé e de Fucus aumentaram a expressão do transportador NPC1L1 e, conseqüentemente, aumenta a recirculação de colesterol para ser eliminado no fígado.

Em suma, todos os objetivos propostos neste trabalho foram cumpridos tendo-se caracterizado os extratos de algas marinhas comestíveis, nomeadamente, Aramé, Nori e Fucus; avaliado a capacidade dos extratos reduzirem a permeação do colesterol e o seu efeito nas proteínas transportadoras de colesterol bem como o seu mecanismo de atuação; e investigou-se a influência dos extratos nas linhas celulares humanas no intestino e do fígado.

Pela primeira vez, no grupo de investigação, foi determinada a atividade inibitória do HMGR para os extratos de Aramé e Nori, e concluiu-se que o extrato mais eficaz para controlar a síntese de novo colesterol é o extrato de Aramé; confirmou-se também pela primeira vez que os extratos de Nori e Aramé têm efeito na barreira gastrointestinal, levando a uma diminuição da permeação do colesterol proveniente e, que afetam a expressão dos transportadores de colesterol.

O extrato de Nori revelou ter potencial no tratamento/ prevenção da doença de Alzheimer, enquanto, os extratos de Aramé e Fucus ter potencial no tratamento/ prevenção da hipercolesterolemia.

O extrato de Aramé foi mais eficiente no tratamento/prevenção de DCVs pois, apresentou maior atividade inibitória do HMGR, na terapia combinada com a ezetimiba apresentou uma redução da permeação do colesterol da mesma ordem de grandeza do fármaco sozinho. Além das vantagens nas DCVs, o extrato de Aramé também é o que apresenta maior poder antioxidante. E, segundo a análise do metaboloma este também

aumentou a hipoxantina em comparação com as células controlo, revelando potencial para o tratamento/prevenção da doença de Alzheimer.

5.2. Perspetivas Futuras

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram ser bastante promissores. Portanto, seria muito interessante continuar este estudo, com os seguintes planos:

- Identificar os compostos presentes nos extratos de Aramé, Nori e Fucus, injetados no RP HPLC-DAD, por LC-QTOF-MS.
- Determinar o EC₅₀ da atividade inibitória do enzima HMGR para o extrato de Aramé.
- Extrair os lípidos de células Caco-2 e Hep-G2, em contacto com os extratos de Aramé, Nori e Fucus, analisá-los por LC-QTOF-MS e, assim, comparar o efeito que os extratos de algas marinhas comestíveis têm sob as células.
- Estudar o metaboloma das células Caco-2 utilizadas no estudo da permeação do colesterol.
- Os compostos propostos que foram identificados na metabolómica devem ser confirmados através da sua fragmentação e da massa.
- Estudar melhor a modificação de proteínas recorrendo a uma eletroforese 2D para melhor separar as proteínas e proceder à sua identificação.
- Efetuar um ensaio de *Western Blotting* para as proteínas transportadoras de colesterol com as células Caco-2 utilizadas no estudo da permeação do colesterol.
- Estudar a interação das estatinas com os extratos de Aramé, Nori e Fucus.
- Estudar o mecanismo dos fármacos utilizados na redução da hipercolesterolemia no mRNA e não no produto final (proteínas) e compará-lo com o efeito que os extratos das algas marinhas comestíveis têm sob o mRNA.

Referências Bibliográficas

- [1] - GBD 2016 Causes of Death Collaborators. (2017). Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet* 390, pp. 1151–1210.
- [2] - Townsend N., Nichols M., Scarborough P., Rayner M., (2015). Cardiovascular disease in Europe—epidemiological update 2015. *Eur Heart J* 36, pp. 2696-2705.
- [3] - Rozner, S., Garti, N., (2006). The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 282, pp.435–456.
- [4] - Weingärtner, O., Lütjohann, D., Vanmierlo, T., Müller, S., Günther, L., Herrmann, W., Herrmann, M., (2011). Markers of enhanced cholesterol absorption are a strong predictor for cardiovascular diseases in patients without diabetes mellitus. *Chemistry and Physics of Lipids*, 164, 6, pp. 451–456.
- [5] - Espinheira, M., C., Vasconcelos, C., Medeiros, A., M., Alves, A., C., Bourbon, M., Guerra, A. (2013). Hipercolesterolemia—Uma patologia com expressão desde a idade pediátrica. *Rev. Port. Cardiol*, 32, pp. 379–386.
- [6] – Human metabolome database, consultado a 5 de abril de 2021 pelas 19:58. Fonte: Human Metabolome Database: Showing metabocard for Cholesterol (HMDB0000067)
- [7] – Organização Mundial de Saúde, consultado a 5 de abril de 2021 pelas 18:54. Fonte: Cardiovascular diseases (CVDs) (who.int)
- [8] – Stone, N., J., Robinson, J., G., Lichtenstein, A., H., Bairey Merz, C., N., Blum, C., B., Eckel, R., H., Goldberg, A., C., Gordon, D., Levy, D., Lloyd-Jones, D., M., et al. (2014). 2013 ACC/AHA Guideline on the Treatment of Blood Cholesterol to Reduce Atherosclerotic Cardiovascular Risk in Adults. *Circulation* 129, pp. 1–45.
- [9] - Choi, E., K., Park, S., H., Ha, K., C., Noh, S., O., Jung, S., J., Chae, H., J., Chae, S., W., Park, T., S. (2015). Clinical trial of the hypolipidemic effects of a brown alga *Ecklonia cava* extract in patients with hypercholesterolemia. *Int. J. Pharmacol.*, 11, pp. 798–805.
- [10] – Santosh, K., S., Shipra, G., Shreesh K., O., Suman, B., S. (2010). Cardiovascular friendly natural products: a promising approach in the management of CVD. *Natural Product Research*, 20, 9, pp. 873-898.
- [11] - Lichtenstein, A., H., Appel, L., J., Brands, M., Carnethon, M., Daniels, S., Franch, H., A., Karanja, N., (2006). Diet and lifestyle recommendations revision 2006: A scientific statement from the American Heart Association Nutrition Committee. *Circulation*, 114, 1, pp. 82–96.

- [12] – André, R., Pacheco, R., Bourbon, M., Serralheiro, M., L. (2021). Brown Algae Potential as a Functional Food against Hypercholesterolemia: Review. *Foods*, 10, 234.
- [13] – Rodwell, V., W., Bender, D., A., Botham, K., M., Kennelly, P., J., Weil, P., A., (2018). *Harper's Illustrated Biochemistry*. McGraw-Hill Education, Lange, New York, 31^a Edição, pp. 509-634.
- [14] - Park, Y., Carr, T., P., (2013). Unsaturated fatty acids and phytosterols regulate cholesterol transporter genes in Caco-2 and HepG2 cell lines. *Nutrition Research*, 33, pp.154–161.
- [15] – Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias, 2^o. (1996). Detecção, avaliação, tratamento. *Arq. Bras. Cardiol.*, 67 pp. 1-16.
- [16] – European Society of Cardiology. (2019). 2019 ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: lipid modification to reduce cardiovascular risk. *European Heart Journal*, 00, pp.1-78.
- [17] – Nordestgaard, B., G., A., (2017). Test in Context: Lipid Profile, Fasting Versus Nonfasting. *J. Am. Coll. Cardiol.* 70, pp. 1637–1646.
- [18] – Teijera, G., G., Ramos, M., G. (1998). Deslipidemia actualidad y perspectivas en la reforma de salud y educación continua para el médico primário, nº 12.
- [19] – Jia, L., Betters, J., L., Yu, L., (2011). Niemann-Pick C1-Like-1 (NPC1L1) protein in intestinal and hepatic cholesterol transport. *Annual Review of Physiology*, 73, pp.239-259.
- [20] – Lu, K., Lee, M., H., Patel, S., B. (2001). Dietary cholesterol absorption; more than just bile. *Trends Endocrinol Metab*, 12, pp.314–20.
- [21] – Cohen, D., E. (1999). Hepatocellular transport and secretion of biliary lipids. *Curr Opin Lipidol*, 10, pp.295–302.
- [22] – Ginsberg, H., N., Fisher, E., A. (2009). The ever-expanding role of degradation in the regulation of apolipoprotein B metabolism. *J Lipid Res* 50, pp.162-166.
- [23] – Adiels, M., Olofsson, S., O., Taskinen, M., R., Borén, J. (2008). Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28, pp.1225-1236.
- [24] – Lewis, G., F. (2006). Determinants of plasma HDL concentrations and reverse cholesterol transport. *Curr Opin Cardiol* 21, pp. 345-352.
- [25] – Angelin, B., Parini, P., Eriksson, M. (2002). Reverse cholesterol transport in man: promotion of fecal steroid excretion by infusion of reconstituted HDL. *Atheroscler Suppl* 3, pp. 23-30.
- [26] – IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (JCBN). (1989). The nomenclature of steroids. Recommendations. *Eur. J. Biochem.* 186, pp. 429–58.

- [27] – Matheus, J., P. (2013). Biossíntese de Colesterol. Pós-graduação em Ciências veterinárias da Universidade Federal, Rio Grande do Sul.
- [28] – Small Molecule Pathway Database, consultado a 5 de abril pelas 20:29. Fonte: <https://smpdb.ca/view/SMP0000023>
- [29] – Steussy, C., N., Critchelow, C., J., Schmidt, T., Min, J., K., Wrensford, L., V., Burgner, J., W., Rodwell, V., W., Stau_acher, C., V., (2013). A novel role for coenzyme A during hydride transfer in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase. *Biochemistry*, 52, pp. 5195–5205.
- [30] – Endo, A., (1992). The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res.*, 33, pp.1569–1582.
- [31] – Gesto, D., S., Pereira, C., M., S., Cerqueira, N., M., E., S., Sousa, S., F. (2020). Na atomic-level perspective of HMG-CoA-Redutase: The target enzyme to treat hypercholesterolemia. *Molecules*, 25, 3891.
- [32] – Osborne, T., F., Gil, G., Goldstein, J., L., Brown, M., S., (1988). Operator constitutive mutation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase promoter abolishes protein binding to sterol regulatory element. *J. Biol. Chem.*, 263, pp. 3380–3387.
- [33] – Brown, M., S., Ye, J., Rawson, R., B., Goldstein, J., L., (2000). Regulated intramembrane proteolysis: A control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell*, 100, pp. 391–398.
- [34] – Sever, N., Yang, T., Brown, M., S., Goldstein, J., L., DeBose-Boyd, R., A., (2003). Accelerated degradation of HMG CoA reductase mediated by binding of insig-1 to its sterol-sensing domain. *Mol. Cell*, 11, pp. 25–33.
- [35] – Beg, Z., H., Stonik, J., A., Brewer, H., B., Jr., (1984). In vivo modulation of rat liver 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase, reductase kinase, and reductase kinase kinase by mevalonolactone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, pp. 7293–7297.
- [36] – Shoichet, B., K. (2004). Virtual screening of chemical libraries. *Nature.*, 432, pp.862–865.
- [37] – Daidone, F., Montioli, R., Paiardini, A., Cellini, B., Macchiarulo, A., Giardina, G., Bossa, F., Voltattorni, C., B. (2012). Identification by virtual screening and in vitro testing of human DOPA decarboxylase inhibitors. *PLoS One.*, 7, 31610.
- [38] – Lin, S-H., Huang, K-J., Weng, C-F., Shiuan, D. (2015). Exploration of natural product ingredients as inhibitors of hman HMG-CoA redutase through structure-based virtual screening. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, pp. 3313-3324.

- [39] – Mahdavi, A., Bagherniya, M., Fakheran, O., Reiner, Z., Xu, S., Sahebkar, A. (2020). Medicinal plants and bioactive natural compounds as inhibitors of HMG-CoA reductase: A literature review. *BioFactors*, 46, pp. 906-926.
- [40] – Arantes, A., A., Falé, P., L., Costa, L., C., B., Pacheco, R., Ascensão, L., (2016). Inhibition of HMG-CoA reductase activity and cholesterol permeation through Caco-2 cells by caffeoylquinic acids from *Vernonia condensata* leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 26, pp. 738-743.
- [41] – Huang, S., Pang, D., Li, X., You, L., Zhao, Z., Cheung, P. C. K., Liu, D. (2019). A sulfated polysaccharide from *Gracilaria Lemaneiformis* regulate cholesterol and bile acid metabolism in high-fat diet mice. *Food & Function*, 10, pp. 3224-3236.
- [42] – Jo, H., G., Kim, M., J., Cheong, S., H., (2019). Sea Tangle (*Saccharina japonica*), an edible brown seaweed, improves serum lipid profiles and antioxidant status in rats fed high-fat and high-cholesterol diets. *Journal of Applied Phycology*, 31, pp. 3957-3967.
- [43] – Alcantara, J., D., Lazaro-Llanos, N., (2020). Mineral availability, dietary fiber contents, and short-chain fatty acid fermentations products of *Caulerpa lentillifera* and *Kappaphycus alvarezii* seaweeds. *KIMIKA*, 31, 1, pp. 1-10.
- [44] – André, R., Guedes, L., Melo, R., Ascensão, L., Pacheco, R., Vaz, P., D., Serralheiro, M., L. (2020). Effect of food preparations on *in vitro* bioactivities and chemical components of *Fucus vesiculosus*. *Foods*, 9, 955.
- [45] – Ye, D., Hoekstra, M., Out, R., Meurs, I., Kruijt, J., K., Hildebrand, R., B., Berkel, T., C., J., V., Eck, M., V., (2008). Hepatic cell-specific ATP-binding cassette (ABC) transporter profiling identifies putative novel candidates for lipid homeostasis in mice. *Atherosclerosis*, 196, 2, pp. 650-658.
- [46] – Méndez-González, J., Julve, J., Rotllan, N., Llaverias, G., Blanco-Vaca, F., Escolà-Gil, J., C., (2011). ATP-binding cassette G5/G8 deficiency causes hypertriglyceridemia by affecting multiple metabolic pathways. *Biochim Biophys Acta*, 1811, 12, pp. 1186-1193.
- [47] – Brown, J., M., Yu, L., (2009). Opposing gatekeepers of apical sterol transport: Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1) and ATP-binding cassette transporters G5 and G8 (ABCG5/ ABCG8). *Immunology, Endocrine & Metabolic Agents in Medicinal Chemistry*, 9, 1, pp. 18-29.
- [48] Yu, X., H., Qian, K., Jiang, N., Zheng, X., L., Cayabyab, F., S., Tang, C., K., (2014). ABCG5/ABCG8 in cholesterol excretion and atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta*, 428, pp. 82–88.
- [49] – Burmaoglu, S., Yilmaz, A., O., Taslimi, P., Algul, O., Kilic, D., Gulcin, I. (2018). Synthesis and biological evaluation of floroglucinol derivatives possessing -glycosidase,

acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, carbonic anhydrase inhibitory activity. *Arch. Pharm.* 351.

[50] - Nutescu, E., A., Shapiro, N., L., (2003). Ezetimibe: A Selective Cholesterol Absorption Inhibitor. *Pharmacotherapy* 23, pp. 1463–1474.

[51] - Wang, L., J., Song, B., L., (2012). Niemann-Pick C1-Like 1 and cholesterol uptake. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1821, 7, pp. 964–972.

[52] – Lv, Y., C., Tang, Y., Y., Peng, J., Zhao, G., J., Yang, J., Yao, F., Tang, C., K., (2014). MicroRNA-19b promotes macrophage cholesterol accumulation and aortic atherosclerosis by targeting ATP-binding cassette transporter A1. *Atherosclerosis*, 236, pp. 215-226.

[53] – Yassine, H., N., Belopolskaya, A., Schall, C., Stump, C., S., Lau, S., S., Reaven, P., D. (2014). Enhanced cholesterol efflux to HDL through the ABCA1 transporter in hypertriglyceridemia of type 2 diabetes. *Metabolism*, 63, pp. 727–734.

[54] - White, C., R., Anantharamaiah, G., M., Datta, G. (2010). HDL mimetic peptides: Novel therapeutic strategies for the treatment of inflammatory vascular disease. In *The HDL Handbook*; Elsevier Inc.: Philadelphia, PA, USA, pp. 179–197. ISBN 9780123821713.

[55] - Wang, Y., J., Bian, Y., Luo, J., Lu, M., Xiong, Y., Guo, S. Y., Chang, T., Y., (2017). Cholesterol and fatty acids regulate cysteine ubiquitylation of ACAT2 through competitive oxidation. *Nature Cell Biology*, 19, 7, pp. 808.

[56] – Wang., D., Q.-H., Portincasa, P., Tso., P., (2017). Transintestinal cholesterol excretion: A secondary, nonbiliary pathway contributing to reverse cholesterol transport. *Hepatology*, 66, 4, pp. 1337-1340.

[57] – Marques, L., R., Diniz, T., A., Antunes, B., M., Rossi, F., E., Caperuto, E., C., Lira, F., S., Gonçalves, D., C. (2018). Reverse cholesterol transport: Molecular mechanisms and the non-medical approach to enhance HDL cholesterol. *Front. Physiol.* 9, 526.

[58] – Dijkers, A., Tietge, U., J., F. (2010). Biliary cholesterol secretion: More than a simple ABC. *World J. Gastroenterol.*, 16, pp. 5936–5945.

[59] – Post, S., M., De Crom, R., Van Haperen, R., Van Tol, A., Princen, H., M., G. (2003). Increased fecal bile acid excretion in transgenic mice with elevated expression of human phospholipid transfer protein. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 23, pp. 892–897.

[60] – Istvan, E., S., Deisenhofer, J. (2000). The structure of the catalytic portion of human HMG-CoA reductase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1529, pp. 9–18.

[61] – Istvan, E., S. (2002). Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am. Heart J.*, 144, pp.27–32.

- [62] – Alberts, A., W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., Rothrock, J., Lopez, M., Joshua, H., Harris, E., Patchett, A., Monaghan, R., Currie, S., Stapley, E., Albers, S., G., Henses, O., Hirshfield, J., Hoogsteen, K., Liesch, J., Springer, J. (1980). Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, pp. 3957–3961.
- [63] – Tobert, J., A. (2003). Lovastatin and beyond: The history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2, pp. 517–526.
- [64] –Endo, A., Kuroda, M., Tanzawa K. (1976). Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett.* 72(2), 323-326.
- [65] – Wang, C., Y., Liu, P., Y., Liao, J., K. (2008). Pleiotropic effects of statin therapy: Molecular mechanisms and clinical results. *Trends Mol. Med.*, 14, pp. 37–44.
- [66] – Istvan, E., S., Deisenhofer, J. (2001). Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. *Science*, 291, pp. 1160 – 1163.
- [67] – Mach, F., Ray, K., K., Wiklund, O., Corsini, A., Catapano, A., L., Bruckert, E., De Backer, G., Hegele, R., A., Hovingh, G., K., Jacobson, T., A., Krauss, R., M., Laufs, U., Leiter, L., A., Marz, W., Nordestgaard, B., G., Raal, F., J., Roden, M., Santos, R., D., Stein, E., A., Stroes, E., S., Thompson, P., D., Tokgozoglu, L., Vladutiu, G., D., Gencer B., Stock, J., K., Ginsberg, H., N., Chapman, M., J., (2018). European Atherosclerosis Society Consensus Panel. Adverse effects of statin therapy: perception vs. the evidence - focus on glucose homeostasis, cognitive, renal and hepatic function, haemorrhagic stroke and cataract. *Eur Heart J* 39, pp. 2526-2539.
- [68] – Collins, R., Reith, C., Emberson, J., Armitage, J., Baigent, C., Blackwell, L., Blumenthal, R., Danesh, J., Smith, G., D., DeMets, D., Evans, S., Law, M., MacMahon, S., Martin, S., Neal, B., Poulter, N., Preiss, D., Ridker, P., Roberts, I., Rodgers. A., Sandercock, P., Schulz, K., Sever, P., Simes, J., Smeeth, L., Wald, N., Yusuf, S., Peto, R. (2016). Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy. *Lancet* 388, pp.2532-2561.
- [69] – Guyton, J., R., Bays, H., E., Grundy, S., M., Jacobson, T., A., (2014). The National Lipid at a unified definition. Position paper from an International Lipid Expert Panel. *Arch Med Sci*, 11, pp. 1-23.
- [70] – Ward, N., C., Watts, G., F., Eckel, R., H., (2019). Statin Toxicity: Mechanistic Insights and Clinical Implications. *Circulation Research*, 124, pp. 328-350.
- [71] – Bays, H. (2002). Ezetimibe. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 11, 11, pp. 1587-1604.

- [72] – Bays, H., E., Moore, P., B., Drehobi, M., A. et al. (2001). Effectiveness and tolerability of ezetimibe in patients with primary hipercholesterolemia: pooled analysis of two phase II studies. *Clin. Ther*, 23(8), pp. 1209-1230.
- [73] – Catapano, A., L. (2001). Ezetimibe: A selective inhinitor of cholesterol absorption. *Eur. Heart J.*, 3, pp. 6-10.
- [74] – Van, H., M., Farley, C., Compton, D., et al (2000). The potente cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, is glucuronidates in the intestine, localizes to the intestine, and circulates enterohepatically. *Atherosclerosis*, 151, 155.
- [75] – Betters, J., L., Yu, L., (2010). NPC1L1 and cholesterol transport. *EEBS Letters*, 584, pp.2740-2747.
- [76] – Yu, L., Bharadwaj, S., Brown, J., M., Ma, Y., Du, W., Davis, M., A., Michaely, P., Liu, P., Willingham, M., C., Rudel, L., L. (2006) Cholesterol-regulated translocation of NPC1L1 to the cell surface facilitates free cholesterol uptake. *J. Biol. Chem.* 281, 6616–6624.
- [77] – Ge, L., Wang, J., Qi, W., Miao, H., H., Cao, J., Qu, Y., X., Li, B., L., Song, B.L. (2008) The cholesterol absorption inhibitor ezetimibe acts by blocking the sterolinduced internalization of NPC1L1. *Cell Metab.* 7, pp. 508–519.
- [78] – Huang, C., Yu, X., Fordstrom, P., Choi, K., Chung, B., C., Roh, S., Chiu, W., Xhou, M., Min, X., Wang, Z. (2020). Cryo-EM structures of NPC1L1 reveal mechanisms of cholesterol transport and ezetimibe inhibition. *Sci. Adv*, 6, pp. 1-11.
- [79] – Phan, B., A., Dayspring, T., D., Toth, P., P. (2012). Ezetimibe therapy: mechanism of action and clinical update. *Vasc Health Risk Manag* 8, pp.415-427.
- [80] – Battaglia, A., Alberto, D., Font, M., Molteni, D., Galvano, A., (2015). Clinical efficacy and safety of Ezetimibe on major cardiovascular endpoint: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *PLoS One*, 10.
- [81] – Danaf, J., A., Martin, S., S., Blumenthal, R., S., (2016). Ezetimibe: The lower the LDL-C, the better (even for total cardiovascular events). *American college of cardiology*.
- [82] – Ambegaonkar, B., M., Tipping, D., Polis, A., B., Tomassini, J., E., Tershakovec, A., M., (2014). Achieving goal lipid levels with ezetimibe plus statin add-on or switch therapy compared with doubling the statin dose. A pooled analysis. *Atherosclerosis*, 237, pp. 829-37.
- [83] – Chag, C., K., Snook, J., T. (2001). The cholesterolaemic effects of dietary fats in cholesteryl ester transfer protein transgenic mice. *Br. J. Nutr*, 85(6), pp. 643-648.
- [84] – Collins, K., G., Fitzgerald, G., F., Stanton, C., Ross, R., P. (2016). Looking beyond the terrestrial: the potential of seaweed derived bioactives to treat non-communicable diseases. *Mar Drugs.*,14, 60.

- [85] – Postma, P., R., Cerezo-Chinarro, O., Akkerman, R., J., Olivieri, G., Wijffels, R., H., Brandenburg, W., A., Eppink, M., H., M. (2018). Biorefinery of the macroalgae *Ulva lactuca*: extraction of proteins and carbohydrates by mild disintegration. *J Appl Phycol.*, 30, pp.1281–1293.
- [86] - Cherry, P., O'Hara, C., Magee, P., J., McSorley, E., M., Allsopp, P., J., (2019). Risks and benefits of consuming edible seaweeds. *Nutr. Rev.* 77, pp. 307–329.
- [87] – MacArtain P, Gill C., I., R., Brooks M., Campbell, R., Rowland, I., R., (2007). Nutritional value of edible seaweeds. *Nutr Rev.* 65 pp. 535–543.
- [88] - Wijesekara, I., Pangestuti, R., Kim, S., K., (2011). Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. *Carbohydr. Polym.* 84, pp.14–21.
- [89] - Roeck-Holtzhauer, Y., Quere, I., Claire, C., (1991). Vitamin analysis of five planktonic microalgae and one macroalga. *J. Appl. Phycol.*, 3, pp. 259–264.
- [90] - El-Said, G., El-Sikaily, A., (2013). Chemical composition of some seaweed from Mediterranean Sea coast, Egypt, *Environ. Monit. Assess.*, 185, pp. 6089–6099.
- [91] - Patarra, R., Paiva, L., Neto, A., Lima, E., Baptista, J., (2011). Nutritional value of selected macroalgae. *J. Appl. Phycol.*, 23, pp. 205–208.
- [92] - Agregán, R., Munekata, P., Franco, D., Dominguez, R., Carballo, J., Lorenzo, J., (2017). Phenolic compounds from three brown seaweed species using LC-DAD – ESI-MS / MS. *Food Res. Int. J.*, 99, pp. 979–985.
- [93] - Gressler, V., Yokoya, N., S., Fujii, M., T., Colepicolo, P., Mancini, J., F., Torres, P., R., Pinto, E., (2010). Lipid, fatty acid, protein, amino acid and ash contents in four Brazilian red algae species. *Food Chem.*, 120, pp. 585–590.
- [94] - Patterson, G., (1971). The Distribution of Sterols in Algae. *Lipids*, 6, pp. 120–127.
- [95] - Güven, K., Percot, A., Sezik, E., (2010). Alkaloids in Marine Algae. *Mar. Drugs*, 8, pp. 269–284.
- [96] - Sava, C., Sîrbu, R., (2010). Analytical study of the determination of flavonoids in Black Sea algae. *Ovidius Univ. Ann. Chem.*, 21, pp. 29–34.
- [97] –Matsukawa, R., Dubinsky, Z., Kishimoto, E., Masaki, K., Masuda, Y., Takeuchi, T., Chihara, M., Yamamoto, Y., Niki, E., Karube, I., (1997). A comparison of screening methods for antioxidant activity in seaweeds, *J. Appl. Phycol.*, 9, pp. 29–35.
- [98] - Noda, H., Amano, H., Arashima, K., Nisizawa, K., (1990). Antitumor activity of marine algae. *Hydrobiologia*, 204, pp. 577–584.
- [99] - Eom, S., H., Kim, Y., M., Kim, S., K., (2012). Antimicrobial effect of phlorotannins from marine brown algae. *Food Chem. Toxicol.*, 50, 9, pp. 3251–3255.

- [100] –Jung, H., A., Jin, S., E., Ahn, B., R., Lee, C., M., Choi, J., S., (2013). Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated. *Food Chem. Toxicol.*, 59, pp. 199–206.
- [101] – Kang, M., Wijesinghe, W., A., J., P., Lee, S., Kang, S., Ko, S., Yang, X., Kang, N., Jeon, B., Kim, J., Lee, D., Jeon, Y., (2013). Dieckol isolated from brown seaweed *Ecklonia cava* attenuates type II diabetes in db/db mouse model. *Food Chem. Toxicol.*, 53, pp. 294–298.
- [102] - Saga, N. (2012). *Porphyra*: Model plants in marine sciences. In *Porphyra yezoensis*; Mikami, K., Ed.; Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge, NY, pp 1–14.
- [103] - Cian, R., E., Drago, S., R., deMedina, F., S., Martínez-Augustin, O., (2015). Proteins and Carbohydrates from Red Seaweeds: Evidence for Beneficial Effects on Gut Function and Microbiota. *Mar. Drugs*, 13, pp. 5358–5383.
- [104] - Pereira, V., K., D., A., N., (2005). Seaweed: Promising Plant of the Millennium. *Sci. Cult.*, 71, pp. 60–66.
- [105] - Niu, J., F., Chen, Z., F., Wang, G., C., Zhou, B., C. (2010). Purification of phycoerythrin from *Porphyra yezoensis* Ueda (Bangiales, Rhodophyta) using expanded bed absorption. *J. Appl. Phycol.*, 22, pp. 25–31.
- [106] - Oh, S., Shin, M., Lee, K., Choe, E. (2013). Effects of water activity on pigments in dried laver (*Porphyra*) during storage. *Food Sci. Biotechnol.*, 22, pp. 1523–1529.
- [107] – “Algae base” disponível em <https://www.algaebase.org/>, consultado a 31/12.
- [108] - Blouin, N., A., Brodie, J., A., Grossman, A., C., Xu, P., Brawley, S., H. (2011) *Porphyra*: a marine crop shaped by stress. *Trends Plant Sci.*, 16, pp. 29–37.
- [109] - Sugawara, T., Sakai, S., Hirata, T. (2012). Nutritional and physiological functions of *Porphyra*. In *Porphyra yezoensis*; Mikami, K., Ed.; Nova Science Publishers, Inc.: Hauppauge, NY, pp 181–193.
- [110] – Bito, T., Teng, F., Watanabe, F. (2017). Bioactive compounds of Edible Purple Laver *Porphyra* sp. (Nori). *J. Agric. Food Chem.*, 65, pp.10685-10692.
- [111] - Brinton, E., Mason, P. (2017). Prescription omega-3 fatty acid products containing highly purified eicosapentaenoic acid (EPA). *Lipids Health Dis.*, 16, 23.
- [112] - Cao, J., Wang, J., Wang, S., Xu, X. (2016). *Porphyra* Species: A minireview of its pharmacological and nutritional properties. *J. Med. Food*, 19, pp. 111–119.
- [113] - Okai, Y., Higashi-Okai, K., Nakamura, S., Yano, Y., Otani, S. (1994). Suppressive effects of the extracts of Japanese edible seaweeds on mutagen-induced umu C gene expression in *Salmonella typhimurium* (TA 1535/pSK 1002) and tumor promoter-dependent ornithine decarboxylase induction in BALB/c 3T3 fibroblast cells. *Cancer Lett.*, 87, pp. 25–32.

- [114] - Bhatia, S., Rathee, P., Sharma, K., Chaugule, B., B., Kar, N., Bera, T. (2013). Immuno-modulation effect of sulphated polysaccharide (porphyran) from *Porphyra vietnamensis*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 57, pp. 50–56.
- [115] – Zhang, Z., Zhang, Q., Wang, J., Song, H., Zhang, H., Niu, X. (2010). Regioselective syntheses of sulfated porphyrans from *Porphyra haitanensis* and their antioxidant and anticoagulant activities in vitro. *Carbohydr Polym* 79, pp.1124–1129.
- [116] – Liu, Q., M., Xu, S., S., Li, L., Pan, T., M., Shin, C., L., Liu, H., Cao, M., J., Su, W., J., Liu, G., M. (2017). In vitro and in vivo immunomodulatory activity of sulfated polysaccharide from *Porphyra haitanensis*. *Carbohydr Polym* 165, pp. 189–196.
- [117] – Inoue, N., Yamano, N., Sakata, K., Nagao, K., Hama, Y., Yanagita, T. (2009). The sulfated polysaccharide porphyran reduces apolipoprotein B 100 secretion and lipid synthesis in HepG2 cells. *Biosci., Biotechnol., Biochem.*, 73, pp. 447–449.
- [118] - Kitano, Y., Murazumi, K., Duan, J., Kurose, K., Kobayashi, S., Sugawara, T., Hirata, T. (2012). Effect of dietary porphyran from the red alga, *porphyra yezoensis*, on glucose metabolism in diabetic KK-Ay mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 58, pp. 14–19.
- [119] – Zhang, Z., S., Wang, X., M., Han, Z., P., Yin, L., Zhao, M., X., Yu, S., C. (2012). Physicochemical properties and inhibition effect on iron deficiency anemia of a novel polysaccharide-iron complex (LPPC). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22, pp. 489–492.
- [120] - Gotteland M., Riveros K., Gasaly N., Carcamo C., Magne F., Liabeuf G., Beattie A., Rosenfeld S., (2020). The Pros and Cons of Using Algal Polysaccharides as Prebiotics. *Frontiers in Nutrition*, 7.
- [121] – Admassu, H., Gasmalla, M., A., A., Yang, R., Zhao, W. (2018). Bioactive peptides derived from seaweed protein and their health benefits: antihypertensive, antioxidant, and antidiabetic properties. *J Food Sci.*, 83, pp. 6–16.
- [122] – Saito, M., Hagino, H. (2005). Antihypertensive effect of oligopeptides derived from nori (*Porphyra yezoensis*) and Ala-Lys-Tyr-Ser- Tyr in rats. *J Jpn Soc Nutr Food Sci* 58, pp. 177–184
- [123] – Cian, R., E., López-Posadas R., Drago, S., R., Sánchez de Medina F., Martínez-Augustin, O. (2012). A *Porphyra columbina* hydrolysate upregulates IL-10 production in rat macrophages and lymphocytes through an NF- γ B, and p38 and JNK dependent mechanism. *Food Chem* 134, pp. 1982–1990.
- [124] – Park, S., J., Ryu, J., Kim, I., H., Choi, Y., H., Nam, T., J. (2014). Induction of apoptosis by a peptide from *Porphyra yezoensis*: regulation of the insulin-like growth factor I receptor signaling pathway in MCF-7 cells. *Int. J. Oncol.*, 45, pp. 1011–1016

- [125] – Park, S., J., Ryu, J., Kim, I., H., Choi, Y., H., Nam, T., J. (2015). Activation of the mTOR signaling pathway in breast cancer MCF-7 cells by a peptide derived from *Porphyra yezoensis*. *Oncol. Rep.*, 33, pp. 19–24.
- [126] – Lee, M., K., Kim, I., H., Choi, Y., H., Nam, T., J. (2015). A peptide from *Porphyra yezoensis* stimulates the proliferation of IEC-6 cells by activating the insulin-like growth factor I receptor signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.*, 35, pp. 533–538.
- [127] – Suetsuna, K. (1998). Purification and identification of angiotensin I converting enzyme inhibitors from the red alga *Porphyra yezoensis*. *J. Mar. Biotechnol.*, 6, pp. 163–167.
- [128] – Cian, R., E., López-Posadas, R., Drago, S., R., Sánchez de Medina, F., Martínez-Augustin, O. (2012). A *Porphyra columbina* hydrolysate upregulates IL-10 production in rat macrophages and lymphocytes through an NF- κ B, and p38 and JNK dependent mechanism. *Food Chem.*, 134, pp. 1982–1990.
- [129] – Yoshiki, M., Tsuge, K., Tsuruta, Y., Yoshimura, T., Koganemaru, K., Sumi, T., Matsui, T., Matsumoto, K. (2009). Production of new antioxidant compound from mycosporine-like amino acid, porphyra-334 by heat treatment. *Food Chem.*, 113, pp. 1127–1132.
- [130] – Choi, Y., H., Yang, D., J., Kulkarni, A., Moh, S., H., Kim, K., W. (2015). Mycosporine-like amino acids promote wound healing through focal adhesion kinase (FAK) and mitogen-activated protein kinases (MAP Kinases) signaling pathway in keratinocytes. *Mar. Drugs*, 13, pp. 7055–7066.
- [131] – Becker, K., Hartmann, A., Ganzera, M., Fuchs, D., Gostner, J. (2016). Immunomodulatory effects of the mycosporine-like amino acids shinorine and porphyra-334. *Mar Drugs* 14, 119.
- [132] – Mercurio, D., G., Wagemaker, T., A., L., Alves, V., M., Benevenuto, C., G., Gaspar, L., R., Maia-Campos, P., M., B., G. (2015). In vivo photoprotective effects of cosmetic formulations containing UV filters, vitamins, Ginkgo biloba and red algae extracts. *J. Photochem. Photobiol.*, 153, pp. 121–126.
- [133] – Ryu, J., Park, S., J., Kim, I., H., Choi, Y., H., Nam, T., J. (2014). Protective effect of porphyra-334 on UVA-induced photoaging in human skin fibroblasts. *Int. J. Mol. Med.*, 34, pp. 796–803.
- [134] – Yanjing, Z., Hong, H., Ying, W. (2012). Anti-oxidant activity of phycocyanin from *Porphyra yezoensis*. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 23, pp. 337–338.
- [135] – Yanjing, Z., Yuncheng, T. (2012). Separation, purification and anti-aging activity of phycocyanin from *Porphyra yezoensis*. *Food Sci.*, 33, pp. 94–97.

- [136] – Sakai, S., Komura, Y., Nishimura, Y., Sugawara, T., Hirata, T. (2011). Inhibition of mast cell degranulation by phycoerythrin and its pigment moiety phycoerthrobilin, prepared from *Porphyra yezoensis*. *Food Sci. Technol. Res.*, 17, pp. 171–177.
- [137] – Cian, R., E., López-Posadas, R., Drago, S., R., Medina, F., S., Martínez-Augustin, O. (2012). Immunomodulatory properties of the protein fraction from *Porphyra columbina*. *J Agric Food Chem* 60, pp. 8146– 8154.
- [138] – Guinea, M., Franco, V., Araujo-Bazán, L., Rodríguez-Martín, I., González, S. (2012). In vivo UVB-photoprotective activity of extracts from commercial marine macroalgae. *Food Chem. Toxicol.*, 50, pp. 1109– 1117.
- [139] - Kazłowska, K., Hsu, T., Hou, C., C., Yang, W., C., Tsai, G., J., (2010). Anti-inflammatory properties of phenolic compounds and crude extract from *Porphyra dentata*. *J. Ethnopharmacol*, 128, pp.123– 130.
- [140] – Li, Y., Wijesekara, I., Li, Y., Kim, S. (2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochem.*, 46, pp. 2219–2224.
- [141] – Moreira, A., R., S., Benedi, J., Bastida, S., Sánchez-Reus, I., Sánchez-Muniz, F., J. (2013). Nori- and sea spaghetti-but not wakame-restructured pork decrease the hypercholesterolemic and liver proapoptotic short-term effects of high-dietary cholesterol consumption. *Nutr Hosp*, 28, pp.1422-1429.
- [142] – Bocanegra, A., Bastida, S., Benedí, J., Nus, M., Sánchez-Montero, J., M., Sánchez-Muniz, F., J. (2009). Effect of seaweed and cholesterol-enriched diets on postprandial lipoproteinaemia in rats. *British Journal of Nutrition*, 102, pp. 1728-1739.
- [143] – Olivero-David, R., Moreira, A., S., Vázquez-Velasco, M., González-Torres, L., Bastida, S., Benedi, J., Sánchez-Reus, M., I., González-Muñoz, M., J., Sánchez-Muniz, F., J. (2011). Effects of Nori- and Wakame-enriched meats with or without supplementary cholesterol or arylesterase activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing wistar rats. *British Journal of Nutrition*, 106, pp. 1476-1486.
- [144] –Hoek, C., Mann, D., Jahns, H., (1995). *Algae: An Introduction to Phycology*, 1a. Cambridge Press.
- [145] - Catarino, M., Silva, A., Cardoso, S., (2018). Phycochemical Constituents and Biological Activities of *Fucus* spp.. *Mar. Drugs*, 16, 249, pp. 1-34.
- [146] – Díaz-Rubio, M., E., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F. (2009). Dietary fiber and antioxidant capacity in *Fucus vesiculosus* products. *Int. J. Food Sci. Nutr.*, 60, pp. 23– 34.
- [147] – Rajauria, G., Foley, B., Abu-Ghannam, N. (2016). Identification and characterization of phenolic antioxidant compounds from brown Irish seaweed

Himanthalia elongata using LC-DAD–ESI-MS/MS. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 37, pp. 261–268.

[148] – Bouga, M., Combet, E. (2015). Emergence of Seaweed and Seaweed-Containing Foods in the UK: Focus on Labeling, Iodine Content, Toxicity and Nutrition. *Foods*, 4, pp.240–250.

[149] – Wang, T., Jónsdóttir, R., Ólafsdóttir, G. (2009). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chem.*, 116, pp. 240–248.

[150] – Catarino, M., D., Silva, A., M., S., Mateus, N., Cardoso, S., M. (2019). Optimization of phlorotannins extraction from *Fucus vesiculosus* and evaluation of their potential to prevent metabolic disorders. *Mar. Drugs*, 17, 162.

[151] – Singh, I., P., Sidana, J. (2013). Phlorotannins. In *Functional Ingredients from Algae for Foods and Nutraceuticals*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands,, pp. 181–204.

[152] – Wang, T., Jónsdóttir, R., Liu, H., Gu, L., Kristinsson, H., G., Raghavan, S., Ólafsdóttir, G. (2012). Antioxidant capacities of phlorotannins extracted from the brown algae *Fucus vesiculosus*. *J. Agric. Food Chem.*, 60, pp. 5874–5883.

[153] – Li, Y.-X., Wijesekara, I., Li, Y., Kim, S.-K. (2011). Phlorotannins as bioactive agents from brown algae. *Process Biochem.*, 46, pp. 2219–2224.

[154] – Choi, E., K., Park, S., H., Ha, K., C., Noh, S., O., Jung, S., J., Chae, H., J., Park, T., S. (2015). Clinical trial of the hypolipidemic effects of a brown alga *Ecklonia cava* extract in patients with hypercholesterolemia. *Intl. J. Pharmacol.*, 11, pp. 798–805.

[155] – Yeo, A., R., Lee, J., Tae, I., H., Park, S., R., Cho, Y., H., Lee, B., H., Yoo, Y., C. (2012). Anti-hyperlipidemic effect of polyphenol extract (Seapolynol™) and dieckol isolated from *ecklonia cava* in in vivo and in vitro models. *Prev. Nutr. Food Sci.*, 17.

[156] – Beaulieu, L. (2019). Bioactive Peptides Using Proteomic and Transcriptomic Approaches. *Molecules*, 24, 1708.

[157] – Kim, S., K., Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. *J. Funct. Foods*, 2.

[158] – Benede, S., Molina, E. (2020). Chicken Egg Proteins and Derived Peptides with Antioxidant Properties. *Foods*, 9, 735

[159] – Gärtner, R. (2016). Recent data on iodine intake in Germany and Europe. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 37, pp. 85–89.

[160] – Whelton, P., K. (2014). Sodium, potassium, blood pressure, and cardiovascular disease in humans. *Curr. Hypertens. Rep.*, 16, 465.

- [161] – Catarino, M., D., Silva, A., M., S., Cardoso, S., M. (2018). Phycochemical constituents and biological activities of *Fucus* spp. *Mar. Drugs*, 16, 249
- [162] – Circuncisão, A., R., Catarino, M., D., Cardoso, S., M., Silva, A., M., S. (2018). Minerals from macroalgae origin: Health benefits and risks for consumers. *Mar. Drugs*, 16, 400.
- [163] – Dore, C., M., P., G., Faustino A., M., G., C., Pofirio, W., L., S., E., Costa, T., G., Sabry, D., A., de Souza R., L., A., R., Leite, E., L., (2013). A sulfated polysaccharide, fucans, isolated from brown algae *Sargassum vulgare* with anticoagulant, antithrombotic, antioxidant and anti-inflammatory effects. *Carbohydrate Polymers*, 91(1), pp. 467–475.
- [164] –Atashrazm, F., Lowenthal, R., Woods, G., Holloway, A., Dickinson, J., (2015). Fucoidan and cancer: a multifunctional molecule with anti-tumor potential, *Mar. Drugs* 13(4), pp. 2327–2346.
- [165] –Ahmed, Z., Roland, U., (2019). Fucoidan production: approval key challenges and opportunities, *Carbohydr. Polym.* 211, pp. 289–297.
- [166] - Kim, E., S., Lee, J., S., Lee, H., G., (2016). Nanoencapsulation of red ginseng extracts using chitosan with polyglutamic acid or fucoidan for improving antithrombotic activities, *J. Agric. Food. Chem.* 64 (23), pp. 4765–4771.
- [167] – Cuong, H., D., Thuy, T., T., T., Huong, T., T., Ly, B., M., Van, T., T., T. (2015). Structure and hypolipidaemic activity of fucoidan extracted from brown seaweed *Sargassum henslowianum*. *Nat. Prod. Res.*, 29, pp. 411–415.
- [168] – Kim, K., J., Yoon, K., Y., Lee, B., Y. (2012). Fucoidan regulate blood glucose homeostasis in C57BL/KSJ m+/+db and C57BL/KSJ db/db mice. *Fitoterapia*, 83, pp. 1105–1109.
- [169] – Cardoso, S., M., Carvalho, L., G., Silva, P., J., Rodrigues, M., S., Pereira, O., R., Pereira, L. (2014). Bioproducts from seaweeds: A review with special focus on the Iberian Peninsula. *Curr. Org. Chem.*, 18, pp. 896–917.
- [170] – Ahmadi, A., Moghadamtousi, S., Z., Abubakar, S., Zandi, K. (2015). Antiviral potential of algae polysaccharides isolated from marine sources: a review. *BioMed Research International*, 2015.
- [171] – Yoshida, T., (1970). On the productivity of the *Eisenia bicyclis* community. *Bull. Tohoku Reg. Fish. Res. Lab.*, 30, pp.107- 112. (in Japanese with English abstract)
- [172] – Hori, T., (1993). Na illustrated atlas of the life history of algae. Brown and red algae. Uchida Rokakuho Publishing Co, Ltd, Tokyo, Japan, 2, pp. 345.
- [173] – Kang, R., S., Won, K., S., Hong, K., P., Kim, J., M., (2001). Population studies on the kelp *Ecklonia cava* and *Eisenia bicyclis* in Dokdo, Korea. *Algae*, 16(2), pp. 209-215.

- [174] – Choi, H., G., Jeon, D., V., Park, S., K., Gao, X., (2019). Physiological differences in the growth and maturation of *Eisenia bicyclis* and *Ecklonia cava* gametophytes in Korea. *Journal of Oceanology and Limnology*, 37(2), pp. 657-664.
- [175] – Gupta, S., Abu-Ghannam, N., (2011). Bioactive potential and possible health effects of edible Brown seaweeds. *Trends in food Science & Technology*, 22, pp. 315-326.
- [176] – Chakraborty, K., Paulraj, R. (2010). Sesquiterpenoids with free-radical-scavenging properties from marine macroalga *Ulva fasciata* Delile. *Food Chem.*, 122, pp. 31–41.
- [177] – Jung, H., A., Jin, S., E., Ahn, B., R., Lee, C., M., Choi J., S. (2013). Anti-inflammatory activity of edible brown alga *Eisenia bicyclis* and its constituents fucosterol and phlorotannins in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol* 59, pp.199–206.
- [178] – Kojima, T., Koike, A., Yamamoto, S., Kanemitsu, T., Miwa, M., Kamei, H., Kondo, T., Iwata, T. (1993). Eisenin (l-pyroGlu-l-Gln-l-Ala), a new biological response modifier. *J. Immunother.* 13, pp. 36–42.
- [179] – Kousaka, K., Ogi, N., Akazawa, Y., Fujieda, M., Yamamoto, Y., Takada, Y., Kimura, J. (2003). Novel oxylipin metabolites from the brown alga *Eisenia bicyclis*. *J. Nat. Prod.* 66, pp. 1318–1323.
- [180] – Meenakshi, S., Gnanambigai, D., M., Mozhi, S., T., Arumugam, M., Balasubramanian, T. (2009). Total flavanoid and in vitro antioxidant activity of two seaweeds of Rameshwaram coast. *Glob. J. Pharm.*, 3, pp. 59–62.
- [181] – Okada, Y., Ishimaru, A., Suzuki, R., Okuyama, T. (2004). A new phloroglucinol derivative from the brown alga *Eisenia bicyclis*: potential for the effective treatment of diabetic complications. *J. Nat. Prod.* 67, pp.103–105.
- [182] – Lee, S., H., Karadeniz, F., Kim, M., M., Kim, S., K. (2009). α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of phloroglucinal derivatives from edible marine brown alga, *Ecklonia cava*. *J. Sci. Food Agric.* 89, pp. 1552–1558.
- [183] – Shibata, T., Ishimaru, K., Kawaguchi, S., Yoshikawa, H., Hama, Y. (2008). Antioxidant activities of phlorotannins isolated from Japanese Laminariaceae. *J. Appl. Phycol.* 20, pp. 705–711.
- [184] – Lee, S., H. (2010). Anti-inflammatory Mechanisms of Phlorotannins Derived from *Eisenia bicyclis* and Their inhibitory Effects on Matrix Metalloproteinases. Pukyong National University, Busan, South Korea.

- [185] – Yoon, N., Y., Chung, H., Y., Kim, H., R., Choi, J., S. (2008). Acetyl and butyrylcholinesterase inhibitory activities of sterols and phlorotannins from *Ecklonia stolonifera*. *Fisheries Sci.* 74, pp. 200–207.
- [186] – Yoon, N., Y., Kim, H., R., Chung, H., Y., Choi, J., S. (2008). Anti-hyperlipidemic effect of an edible brown algae, *Ecklonia stolonifera*, and its constituents on poloxamer 407-induced hyperlipidemic and cholesterol-fed rats. *Arch. Pharm. Res.* 31, pp. 1564–1571.
- [187] - Machu, L., Misurcova, L., Ambrozova, J., V., Orsavova, J., Micek, J., Sochor, J., Jurikova, T., (2015). Phenolic content and antioxidant capacity in algal food products. *Molecules*, 20, pp. 1118–1133.
- [188] – Peadhan, B., Nayak, R., Patra, S., Jit, B., P., Ragusa, A, Jena, M. (2021). Bioactive Metabolites from Marine Algae as potente pharmacophores against oxidative stress-associated human diseases: A comprehensive Review. *Molecules*, 26, 37.
- [189] - Svetlana E., Roza M., Olesya V., Sang-Min K., Byung-Hun U., Vladimir I., Tatyana Z., (2013). Water-soluble polysaccharides from the brown alga *Eisenia bicyclis*: Structural characteristics and antitumor activity. *Algal Research*, 2, 1, pp. 51-58.
- [190] – Irfan, M., Kwon, T-H., Yun, B-S., Park, N-H., Rhee, M., H. (2018). *Eisania bicyclis* (brown alga) modulates platelet function and inhibits thrombus formation via impaired P₂Y₁₂ receptor signaling pathway. *Phytomedicine*, 40, pp.79-87.
- [191] – Kang, Y-M. Eom, S-H., Kim, Y-M. (2013). Protective Effect of phlorotannins from *Eisenia bicyclis* against lipopolysaccharide-stimulated inflammation in HepG2 cells. *Environmental Toxicology and pharmacology*, 35, pp. 395-401.
- [192] – Ezzat, S., M., Bishbishy, M., H., E., Habtemariam, S., Salehi, B., Sharifi-Rad, M., Martins, N., Sharifi-Rad, J. (2018). Looking at Marine-Derived bioactive molecules as upcoming anti-diabetic agents: A special emphasis on PTP1B inhibitors. *Molecules*, 23, 3334.
- [193] – Guedes, A., Amaro, H., M., Malcata, F., X. (2011). Microalgae as sources of high added-value compounds—a brief review of recent work. *Biotechnol Prog*, 27, pp.597–613.
- [194] – Birben, E., Sahiner, U., M., Sackesen, C., Erzurum, S., Kalayci, O., (2012). Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.*, 5, 1, pp. 9-19.
- [195] - Pham-Huy, L., He, H., Pham-Huy, C., (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int. J. Biomed. Sci.*, 4, pp. 89–96.
- [196] – Cheeseman, K., H., Slater, T., F., (1993). An introduction to free radicals chemistry. *Br Med Bull* 49, pp. 481-93.

- [197] – Dhalla, N., S., Temsah, R., M., Netticadan, T., (2000). Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J. Hypertens.*, 18, pp. 655–673.
- [198] – Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Christopher, J., Telser, J., (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.*, 266, pp. 37–56.
- [199] – López-Alarcón, C., Denicola, A., (2013). Evaluating the antioxidant capacity of natural products: a review on chemical and cellular-based assay. *Anal. Chim. Acta*, 736, pp. 1-10.
- [200] – Phaniendra, A., Jestadi, D., Periyasamy, L., (2015). Free Radicals: Properties, Sources, Targets, and Their Implication in Various Diseases. *Indian J. Clin. Biochem.*, 30, pp. 11–26.
- [201] – Pan, X., Zhu, Y., Lin, N., Zhang, J., Ye, Q., Huang, H., (2011). Microglial phagocytosis induced by fibrillar β -amyloid is attenuated by oligomeric β -amyloid: implications for Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.*, 6, pp. 1–17.
- [202] – Sevcsik, E., Trexler, A., Dunn, J., Rhoades, E., (2011). Allostery in a Disordered Protein: Oxidative Modifications to τ -Synuclein Act Distally To Regulate Membrane Binding. *J. Am. Chem. Soc.*, 133, pp. 7152–7158.
- [203] – Witherick, J., Wilkins, A., Scolding, N., Kemp, K., (2010). Mechanisms of Oxidative Damage in Multiple Sclerosis and a Cell Therapy Approach to Treatment. *Autoimmune Dis.*, 2011, pp. 1–11.
- [204] – Beebe, D., Holekamp, M., Shui, Y., B., (2010). Oxidative Damage and the Prevention of Age-Related Cataracts. *Ophthalmic Res.*, 44, pp. 155–165.
- [205] – Vasanthi, P., Nalini, G., Rajasekhar, G., (2009). Status of oxidative stress in rheumatoid arthritis. *Int. J. Rheum. Dis.*, 12, pp. 29–33.
- [206] – M. Bachem et al., (1999). Depending on Their Concentration Oxidized Low Density Lipoproteins Stimulate Extracellular Matrix Synthesis or Induce Apoptosis in Human Coronary Artery Smooth Muscle Cells. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37, pp. 319–326.
- [207] – Oberley, L., (1998). Free radicals and diabetes. *Free Radic. Biol. Med.*, 5, pp. 113–124.
- [208] – Panchatcharam, M., Miriyala, S., Gayathri, V., S., Suguna, L., (2006). Curcumin improves wound healing by modulating collagen and decreasing reactive oxygen species. *Mol Cell Biochem.*, 290, pp. 87–96.

- [209] – Shih, P., H., Yeh, C., T., Yen, G., C., (2007). Anthocyanins induce the activation of phase II enzymes through the antioxidant response element pathway against oxidative stress-induced apoptosis. *J Agric Food Chem.*, 55, pp. 9427–9435.
- [210] – Lotito, S., B., Frei, B., (2006). Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med.*, 41, pp. 1727–1746.
- [211] – Silva, L., Rodrigues, A., M., Ciriani, M., Falé, P., L., V., Teixeira, V., Madeira, P., Machuqueiro, M., Pacheco, R., Florencio, M., H., Ascensão, L., Serralheiro, M., L., M., (2017). Antiacetylcholinesterase activity and docking studies with chlorogenic acid, cynarin and arzanol from *Helichrysum stoechas* (Lamiaceae). *Med Chem Res*, 26, pp. 2942 – 2950.
- [212] – Čolović, M., B., D., Krstić, Z., Lazarević-Pašti T., D., Bondzic, A., M., Vasic, V., M., (2013). Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology*, 11, pp. 315-335.
- [213] – Henriques, J., Falé, P., L., Pacheco, R., Florencio, M., H., Serralheiro, M., L., (2017). Phenolic compounds from *Actinidia deliciosa* leaves: Caco-2 permeability, enzyme inhibitory activity and cell protein profile studies. *Journal of King Saud University – Science*, 30, pp. 513-518.
- [214] – Muller, T., C., Rocha, J., B., T., Morsch, V., M., Neis, R., T., Schetinger, M., R., C., (2002). Antidepressants inhibit human acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1, pp. 92.
- [215] – Fifer, E., K., (2007). Em Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6a. Ed.; Lemke, T. L.; Williams, D. A., eds.; Lippincott Williams & Wilkins, cap. 12.
- [216] – Bharucha, A., E., Low, P., Camilleri, M., Veil, E., Burton, D., Kudva, Y., Shah, P., Gehrking, T., Zinsmeister, A., R., (2013). A randomised controlled study of the effect of cholinesterase inhibition on colon function in patients with diabetes mellitus and constipation. *Gut* 62, pp. 708–715.
- [217] – Colovic, M., B., Krstic, D., Z., Lazarevic-Pasti, T., D., Bondzic, A., M., Vasic, V., M., (2013). Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. *Curr. Neuropharmacol.* 11, pp. 315–335.
- [218] – Mehta, M., Adem, A., Sabbagh, M., (2012). New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Int. J. Alzheimer's Dis*, 2012, pp. 1-8.
- [219] – Shafferman, A., Kronman, C., Flashner, Y., Leitner, M., Grosfeld, H., Ordentlich, A., Gazes, Y., Cohen, S., Ariel, N., Barak, D., Harel, M., Silman, I., Sussman, J., L., Vela, B., (1992). Mutagenesis of human acetylcholinesterase. Identification of residues

involved in catalytic activity and in polypeptide folding. *J Biol Chem*, 267, pp.17640–17648.

[220] – Araújo, C., R., M., Santos, V., L., A., Gonçalves, A., A., (2016). Acetilcolinesterase – AchE: uma enzima de interesse farmacológico. *Revista virtual de Química*, 8(6), pp. 1818- 1834.

[221] – U.S. Department of Health & Human Services, National Institute on Aging, consultado a 14 de Abril de 2021 pelas 15:25. Fonte: Alzheimer's Disease Fact Sheet | National Institute on Aging (nih.gov)

[222] – Mardis, E., R. (2011). A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature*, 470, pp.198-203.

[223] – Weymann, D., Laskin, J., Roscoe, R., Schrader, K., A., Chia, S., Yip, S., Cheung, W., Y., Gelmon, K., A., Karsan, A., Renouf, D., J., Marra, M., Regier, D., A. (2017). The cost and cost trajectory of whole-genome analysis guiding treatment of patients with advanced cancers. *Mol Genet Genomic Med*, 5, pp. 251-60.

[224] – Bais, P., Moon, S., He, K., Leitao, R., Dreher, K., Walk, T., Sucaet, Y., Barkan, L., Wohlgemuth, G., Roth, M., R., Wurtele, E., S., Dixon, P., Fiehn, O., Lange, B., M., Shulaev, V., Sumner, L., W., Welti, R., Nikolau, B., J., Rhee, S., Y., Dickerson, J., A. (2010). PlantMetabolomics.org: a web portal for plant metabolomics experiments. *Plant Physiol.*,152(4), pp. 1807-1816.

[225] – Fiehn, O. (2002). Metabolomics- the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol. Biol.*, 48(1), pp.155-171

[226] – Segers, K., Declerck, S., Mangelings, D., Heyden, Y., V., Eeckhaut, A., V. (2019). Analytical techniques for metabolomic studies: a review. *Bioanalysis*, 11, pp. 2297–2318.

[227] – Newgard, C., B, An, J, Bain, J., R., Muehlbauer, M., J., Stevens, R., D., Lien, L., F., Haqq, A., M., Shah, S., H., Arlotto, M., Slentz, C., A., Rochon, J., Gallup, D., Ilkayeva, O., Wenner, B., R., Yancy, W., S., Jr., Eisenson, H., Musante, G., Surwit, R., S., Millington, D., S., Butler, M., D., Svetkey, L., P. (2009). A branched-chain amino acid-related metabolic signature that differentiates obese and lean humans and contributes to insulin resistance. *Cell Metab*, 9, pp. 311–326.

[228] – Wang, T., J., Larson, M., G., Vasan, R., S., Cheng, S., Rhee, E., P., McCabe, E., Lewis, G., D., Fox, C., S., Jacques, P., F., Fernandez, C., O'Donnell, C., J., Carr, S., A., Mootha, V., K., Florez, J., C., Souza, A., Melander, O., Clish, C., B., Gerszten, R., E. (2011). Metabolite profiles and the risk of developing diabetes. *Nat Med*, 17, pp. 448–453.

[229] – Sharma, K., Karl, B., Mathew, A., V., Gangoiti, J., A., Wassel, C., L., Saito, R., Pu, M., Sharma, S., You, Y., H., Wang, L., Diamond-Stanic, M., Lindenmeyer, M., T.,

- Forsblom, C., Wu, W., Ix, J., H., Ideker, T., Kopp, J., B., Nigam, S., K., Cohen, C., D., Groop, P., H., Barshop, B., A., Natarajan, L., Nyhan, W., L., Naviaux, R., K. (2013). Metabolomics reveals signature of mitochondrial dysfunction in diabetic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*, 24, pp. 1901–1912.
- [230] – Yu, L., Li, K., Zhang, X. (2017). Next-Generation Metabolomics in Lung Cancer Diagnosis, Treatment and Precision Medicine: Mini Review. *Oncotarget*, 8, pp. 115774–115786.
- [231] – Arbona, V., Manzi, M., Ollas, C., D., Gómez-Cadenas, A. (2013) Metabolomics as a tool to investigate abiotic stress tolerance in plants. *Int J Mol Sci*, 14, pp. 4885–4911.
- [232] – Kim, H., K., Choi, Y., H., Verpoorte, R. (2010). NMR-based metabolomic analysis of plants. *Nat Protoc*, 5, pp. 536–549.
- [233] – Ma, Y., Zhang, P., Yang, Y., Wang, F., Qin, H. (2012). Metabolomics in the Fields of Oncology: A Review of Recent Research. *Mol. Biol. Rep.*, 39, pp. 7505–7511.
- [234] – Patti, G., J., Yanes, O., Siuzdak, G. (2012). Metabolomics: the apogee of the omics trilogy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 13(4), pp. 263–269.
- [235] – Johnson, C., H., Ivanisevic, J., Siuzdak, G. (2016). Metabolomics: Beyond biomarkers and towards mechanisms, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 17(7), pp. 451–459.
- [236] – Oliver, S., G., Winson, M., K., Kell, D., B., Baganz, F. (1998). Systematic functional analysis of the yeast genome. *Trends Biotechnol.*, 16, pp. 373-378.
- [237] – Yu, L., Li, K., Zhang, X. (2017). Next-Generation Metabolomics in Lung Cancer Diagnosis, Treatment and Precision Medicine: Mini Review. *Oncotarget*, 8, pp. 115774–115786.
- [238] – Kuehnbaum, N., L., Britz-McKibbin, P. (2013). New advances in separation science for metabolomics: resolving chemical diversity in a post-genomic era. *Chem. Rev.*, 113(4), pp. 2437-2468
- [239] – Beckonert, O., Keun, H., C., Ebbels, T., M., D., Bundy, J., Holmes, E., Lindon, J., C., Nicholson, J., K. (2007). Metabolic profiling, metabolomic and metabonomic procedures for NMR spectroscopy of urine, plasma, serum and tissue extracts. *Nat. Protoc.*, 2(11), 2692-2703.
- [240] – de Raad, M., Fischer, C., R., Northen, T., R. (2016). High-throughput platforms for metabolomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 30, pp. 7-13.
- [241] – Kruger, N., J., (2009). The Bradford Method for protein quantitation. *The protein protocols Handbook*, 3ª edição, pp. 17-24.
- [242] – “Protein atlas” disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000015520-NPC1L1/tissue>.

- [243] – Falé, P., L., et al., (2013). Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7, 20, pp. 1370-1378.
- [244] – Theodoridis, G., A., Gika, H., G., Want, E., J., Wilson, I., D. (2012). Liquid chromatography-mass spectrometry based global metabolite profiling: a review. *Anal. Chim. Acta*, 711, pp. 7-16.
- [245] – Ressaissi, A., Attia, N., Pacheco, R., Falé, P., L., Serralheiro, M., L., M., (2020). Cholesterol transporter proteins in HepG2 cells can be modulated by phenolic compounds presente in *Opuntia ficus-indica* aqueous solutions. *Journal of Functional Foods*, 64, 103674, pp. 1-7.
- [246] – Wang, J., Mitsche, M., A., Lutjohann, D., Cohen, J., C., Xie, X., Hobbs, H., H., (2015). Relative roles of ABCG5/ABCG8 in live rand intestine. *Journal of Lipid Research*, 56, pp. 319-330.
- [247] – De Haan, W., Karasinka, J., M., Ruddle, P., Hayden, M., R., (2014). Hepatic ABCA1 expression improves β - cell function and glucose tolerance. *Diabetes*, 63, pp. 4076-4082.
- [248] – Aworten, C., Fasinu, P., S., Rosenkranz, B., (2014). Application of Caco-2 cell line in herb-drug interaction studies: current approaches and challenges. *J. Pharm. Sci*, 17, pp. 1-19.
- [249] – Engle, M., J., Goetz, G., S., Alpers, D., H., (1998). Caco-2 cells express a combination of colonocyte and enterocyte phenotypes. *J. cel. Physiol.*, 174, pp. 362-369.
- [251] – Garcia-Cañaveras, J., C., Castell, J., V., Donato, M., T., Lahoz, A., (2016) A metabolomics cell-based approach for anticipating and investigation drug-induced liver injury. *Sci Rep.*, 6, 27239.
- [252] – Xiayan, L., Legido-Quigley, C. (208). Advances in separation science applied to metabonomics. *Electrophoresis*, 29(18), pp. 3724-3736.
- [253] – Canuto, G., A., B., Costa, J., L., C., Cruz, P., L., R., Souza, A., R., L., Faccio, A., T., Klassen, A., Rodrigues, K., T., Tavares, M., F., M. (2018). Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas. *Quim, Nova*, 41(1), pp. 75-91.
- [254] – Sugimoto, M., Kawakami, M., Robert, M., Soga, T., Tomita, M. (2012). Bioinformatics tools for mass spectroscopy-based metabolomic data processing and analysis. *Curr. Bioinform.*, 7(1), pp. 96-108.
- [25] – Zayed, A., El-Aasar, M., Ibrahim, A-R., Ulber, R, (2020). Fucoidan Charcaterization: Determination of purity and physicochemical and chemical properties. *Mar. Drugs*, 18, 11, pp. 3-31.

- [256] – Holdt, S., L., Kraan, S., (2011). Bioactive Compounds in seaweeds: functional food applications and legislation. *J Appl Phycol*, 23, pp. 543-597.
- [257] – O'Connor, J., Meaney, S., Williams, G., A., Hayes, M., (2020). Extraction of protein from four different seaweeds using three different physical pre-treatment strategies. *Molecules*, 25, 2005, pp. 1-11.
- [258] – Oonsivilai, R., Ferruzzi, M., G., Ningsanond, S. (2008). Antioxidant activity and cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) extracts. *As. J. Food Ag-Ind*, 1(2), pp. 116-128.
- [259] – Junio, H., A., Sy-Cordero, A., A., Ettefagh, K., A., M., Burns, J., T., Micko, K., T., Graf, T., N., Richter, S., J., Cannon, R., E., Oberlies, N., H., Cech, N., B., (2011). Synergy directed fractionation of Botanical Medicines: A case study with Goldenseal (*Hydrastis canadensis*). *J Nat Prod.*, 74, 7, pp. 1621-1629.
- [260] – Hwang, E-S., Thi, N., D., (2014). Effects of extraction and processing methods on antioxidant compound content and radical scavenging activities of Laver (*Porphyra tenera*). *Prev. Nutr. Food Sci.*, 19, 1, pp. 40-48.
- [261] – Eom, S-H., Kang, Y-M., Park, J-H., Yu, D-U., Jeong, E-T., Lee, M-S., Kim, Y-M., (2011). Enhancement of polyphenol content and antioxidant activity of Brown alga *Eisenia bicyclis* extract by microbial fermentation. *Fish Aquat Sci*, 14, 3, pp. 192-197.
- [262] – Cofrades, S., López-López, I., Bravo, L., Ruiz-Capillas, C., Bastidas, S., Larrea, M., T., Jiménez-Comenero, F. (2010). Nutritional and antioxidant properties of different brown and red Spanish edible seaweeds. *Food Sci Technol Int* 16, pp. 361–370.
- [263] – Choi, J., S., Haulader, S., Karki, S., Jung, H., J., Kim, H., R., Jung, H., A., (2015). Acetyl- and butyryl-cholinesterase inhibitory activities of the edible Brown alga *Eisenia bicyclis*. *Arch. Pharm. Res*, 38, pp. 1477-1487.
- [264] – Jeon, Y., E., Yin, X., F., Lim, S., S., Chung, C-K., Kang, I-J., (2012). Antioxidant Activities and acetylcholinesterase Inhibitory activities from seaweed extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 41, 4, pp. 443-449.
- [265] - Reed, M., C., Thomas, R., L., Pavisic, J., James, S., L., Ulrich, C., M., Nijhout, F., H., (2008). A mathematical model of glutathione metabolism. *Theor Biol Med Model* 5, 8.
- [266] - Qiu, Y., Li, L., Guo, X., Liu, J., Xu, L., & Li, Y. (2022). Exogenous spermine inhibits high glucose/oxidized LDL. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 23, 310.
- [267] - Disponível em: <https://www.genome.jp/pathway/map00480> . Consultado a 16 de julho de 2022.

[268] – Human metabolome Database, disponível em: Human Metabolome Database (hmdb.ca), consultado a 03 de Janeiro de 2022.

[269] - Hirano M., Peters. G., J., (2016). Advances in purine and pyrimidine metabolism in health and diseases. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, 35(10-12), pp. 495-501.

[270] – Rindi, G., Laforenza, U., (2000). Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects. *Proc Soc Exp Biol Med*, 224, 4, pp. 246-255.

[271] – Said, H., M., Reidling, J., C., Ortiz, A., (2002). Cellular and molecular aspects of thiamin uptake by human liver cells: studies with cultured HepG2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Volume 1567, pp. 106-112.

[272] - Disponível em KEGG PATHWAY: Arachidonic acid metabolism - Reference pathway (genome.jp). Consultado a 16 de julho de 2022.

[273] - Disponível em KEGG PATHWAY: Folate biosynthesis - Reference pathway (genome.jp). Consultado a 16 de julho de 2022.

[274] - Disponível em KEGG PATHWAY: Tryptophan metabolism - Reference pathway (genome.jp). Consultado a 16 de julho de 2022.

[275] - Disponível em KEGG PATHWAY: Riboflavin metabolism - Reference pathway (genome.jp). Consultado a 16 de julho de 2022.

[276] - Disponível em KEGG PATHWAY: Pyruvate metabolism - Reference pathway (genome.jp). Consultado a 16 de julho de 2022.

[277] - Disponível em KEGG PATHWAY: Taurine and hypotaurine metabolism - Reference pathway (genome.jp). Consultado a 16 de julho de 2022.

[278] - Disponível em KEGG PATHWAY: Purine metabolism - Reference pathway (genome.jp). Consultado a 16 de julho de 2022.

[279] - Disponível em KEGG PATHWAY: Pantothenate and CoA biosynthesis - Reference pathway (genome.jp). Consultado a 16 de julho de 2022.

[280] - Disponível em KEGG PATHWAY: Thiamine metabolism - Reference pathway (genome.jp). Consultado a 16 de julho de 2022.

[281] - Disponível em KEGG PATHWAY: Alanine, aspartate and glutamate metabolism - Reference pathway (genome.jp). Consultado a 16 de julho de 2022.

[282] - Disponível em KEGG PATHWAY: Glycine, serine and threonine metabolism - Reference pathway (genome.jp). Consultado a 16 de julho de 2022.

[283] - Prasad, S., Iyer, N., Xiaorui Y., Crona, J., H., Hoos, L., M., Tetzloff, G., Davis, H., R., Graziano, M., P., Altmann, S., W., (2005). Characterization of the putative native and recombinant rat sterol transporter Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) protein, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1722, 3, pp. 282-292.

[284] – Davies, P., J., Scott C., Oishi, K., Ioannou, Y., A., (2005). Inactivation of NPC1L1 causes multiple lipid transport defects and protects against diet-induced hypercholesterolemia. *J Biol Chem*, 280, 13, pp. 12710-12720.

Anexos

1. Caracterização de extratos

1.1. Quantificação de fenóis totais

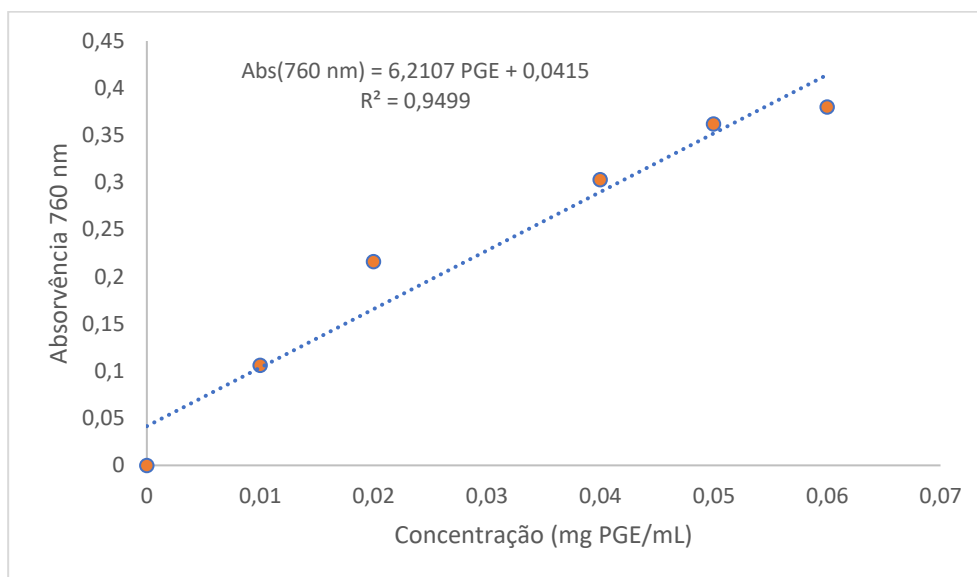


Figura 37 - Reta de Calibração para a quantificação de fenóis totais, usando FLG como padrão.

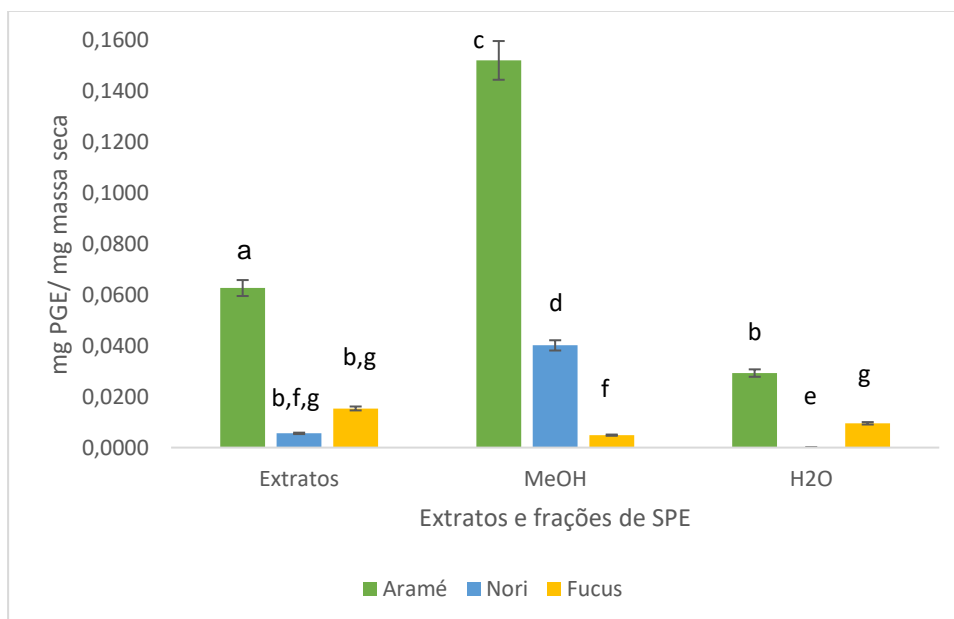


Figura 38 - Quantidade de fenóis totais por quantidade de extrato para os extratos e frações de SPE, sendo uma fração da lavagem com água (H₂O) e outra fração da extração com metanol (MeOH). As letras a-g correspondem a valores estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95%.

1.2. Quantificação de polissacáridos

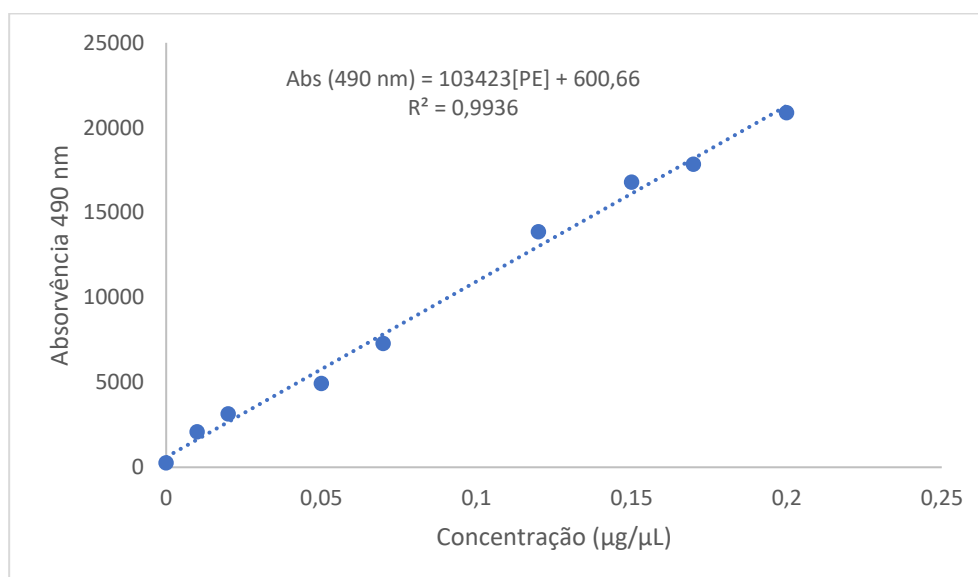


Figura 39 - Reta de Calibração para quantificação de polissacáridos, usando ácido poligalacturônico como padrão.

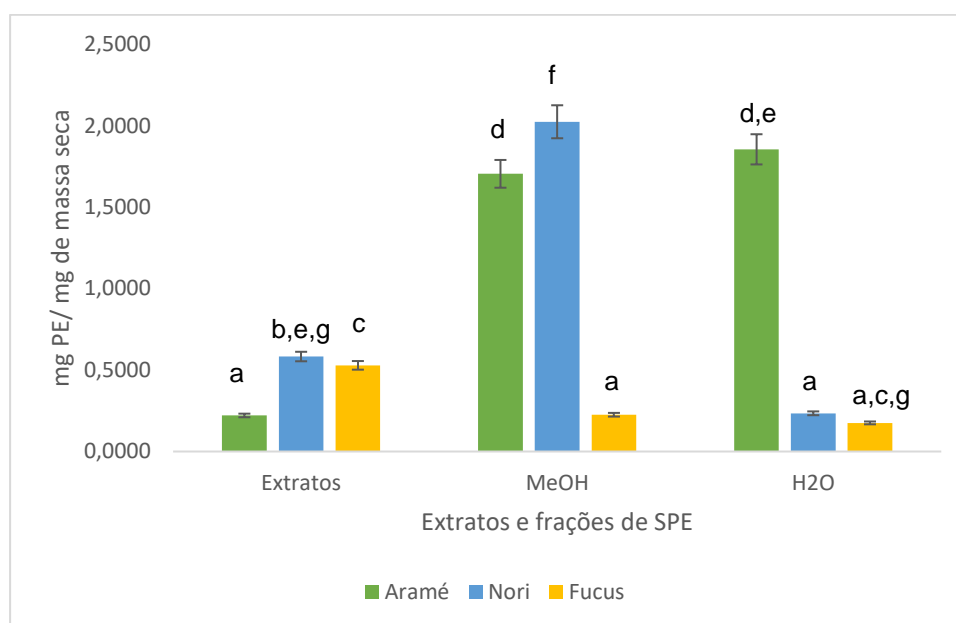


Figura 40 - Quantidade de polissacáridos por quantidade de extratos para os extratos e frações de SPE, sendo uma fração da lavagem com água (H₂O) e outra fração da extração com metanol (MeOH). As letras a-g correspondem a valores estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95%.

1.3. Reta de Calibração para quantificação de proteínas

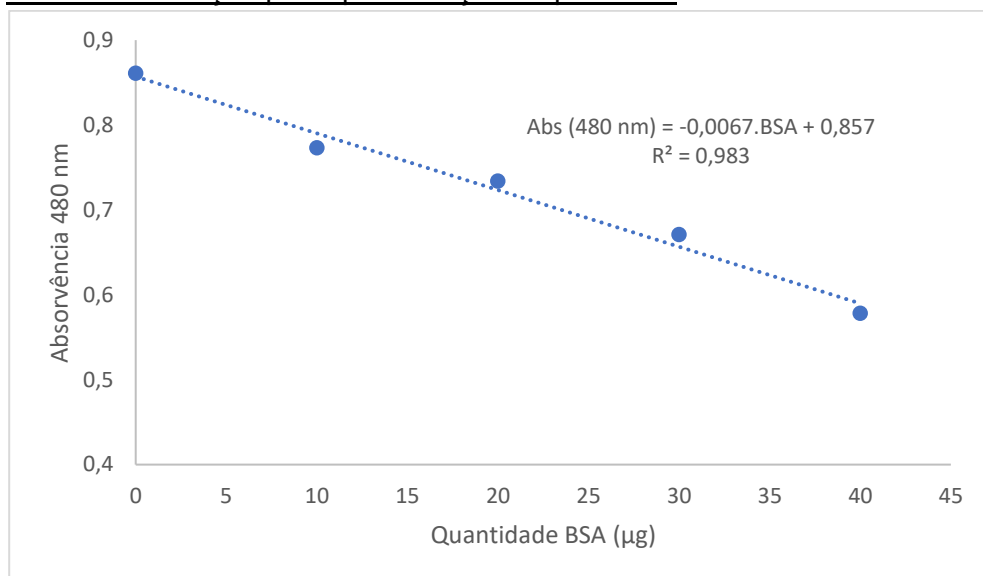


Figura 41 - Reta de Calibração para quantificação de proteínas, usando BSA como padrão.

1.4. Cromatograma do extrato de Aramé e frações purificadas

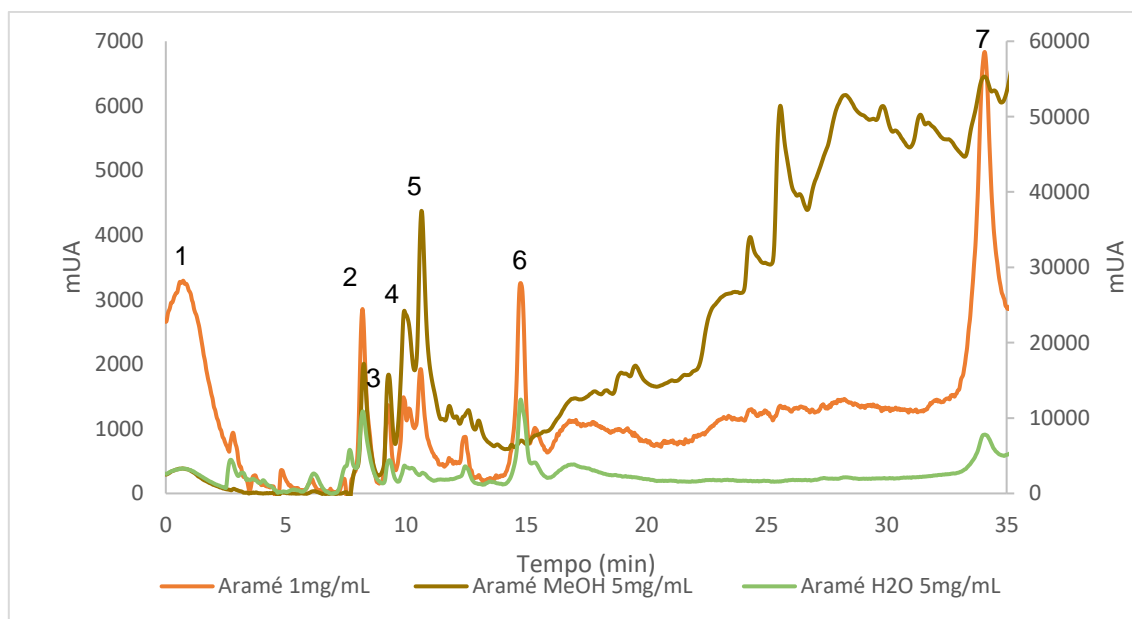


Figura 42 - Cromatogramas obtidos para extrato de Aramé, Aramé MeOH e Aramé H₂O. A intensidade para o extrato de Aramé encontra-se representada no eixo esquerdo, e para as frações purificadas no eixo direito.

1.5. Cromatograma do extrato de Nori e frações purificadas

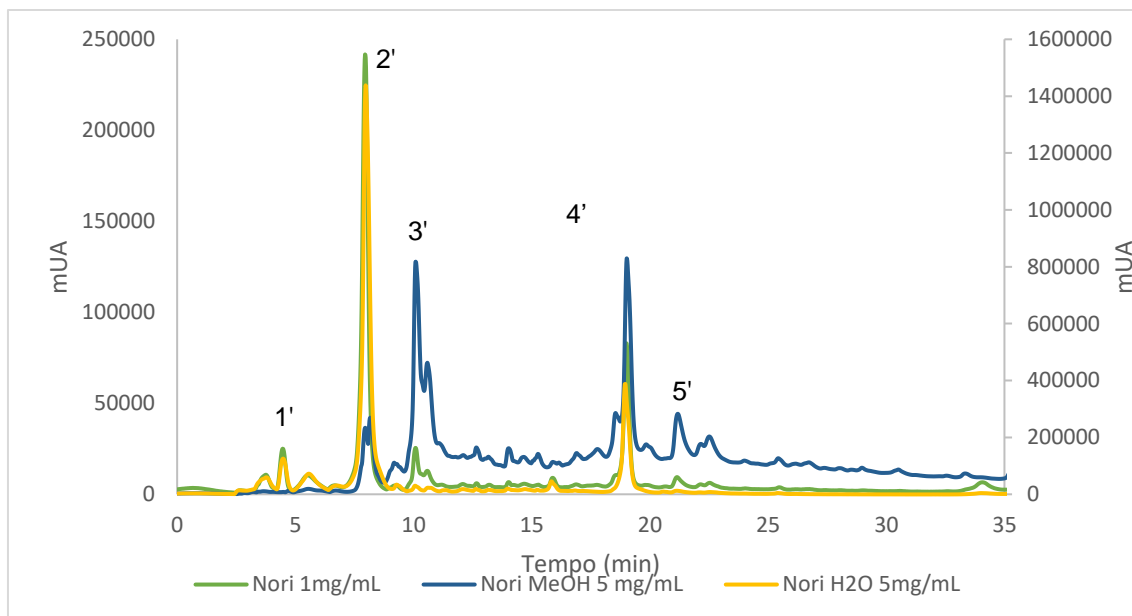


Figura 43 - Cromatogramas obtidos para extrato de Nori, Nori MeOH e Nori H2O. A intensidade para o extrato de Nori encontra-se representado no eixo esquerdo, enquanto, os extratos purificados encontram-se representados no eixo direito.

1.6. Cromatograma do extrato de Fucus e frações purificadas

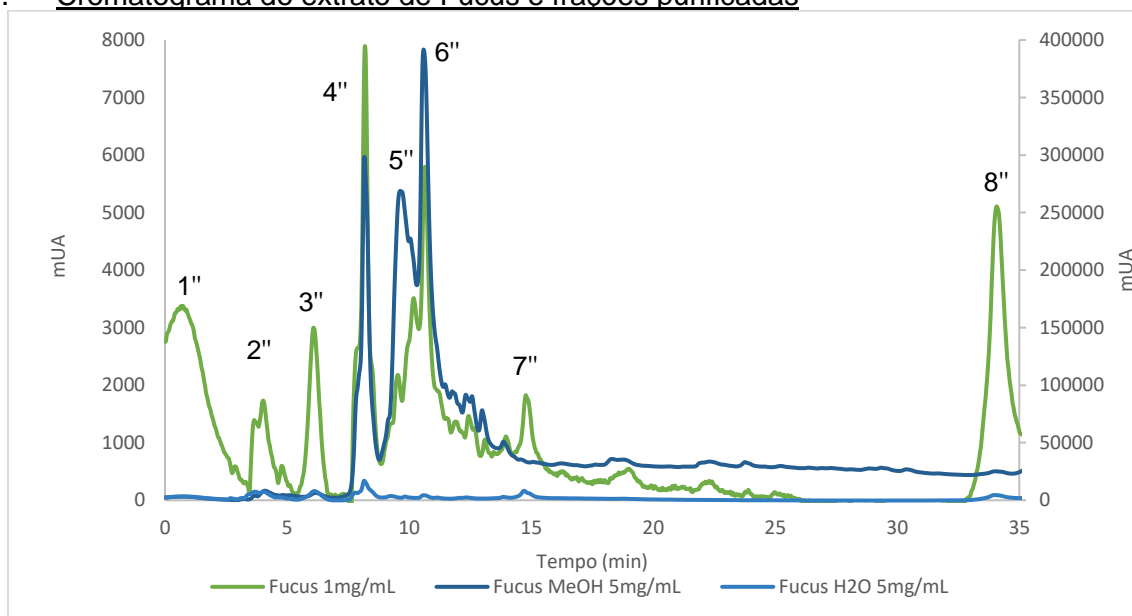


Figura 44 - Cromatogramas obtidos para extrato de Fucus, Fucus MeOH e Fucus H2O. A intensidade para o extrato de Fucus encontra-se representado no eixo esquerdo, enquanto, os extratos purificados encontram-se representados no eixo direito.

1.7. Cromatograma floroglucinol

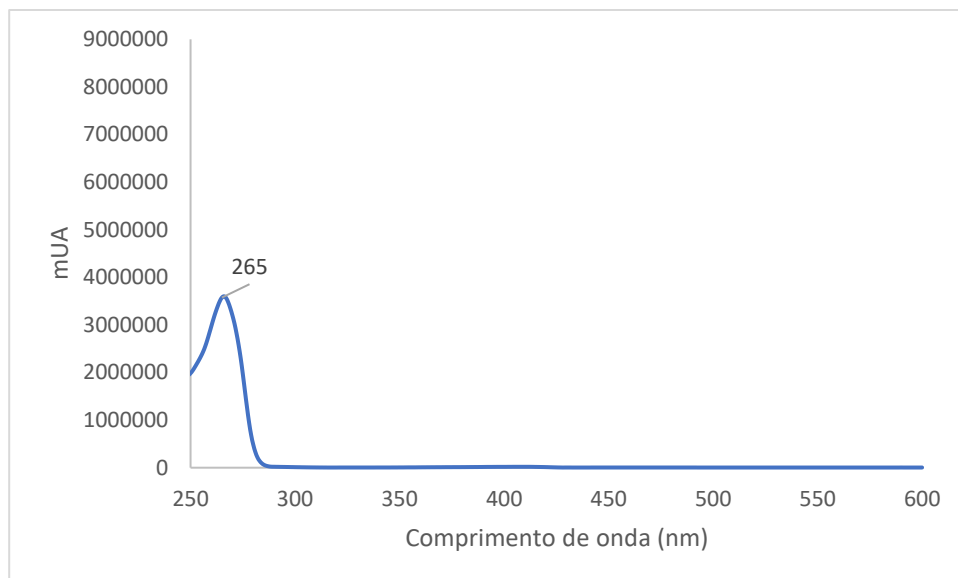


Figura 45 – Espectro UV-Visível do floroglucinol.

1.8. Cromatograma floroglucinol 265 nm

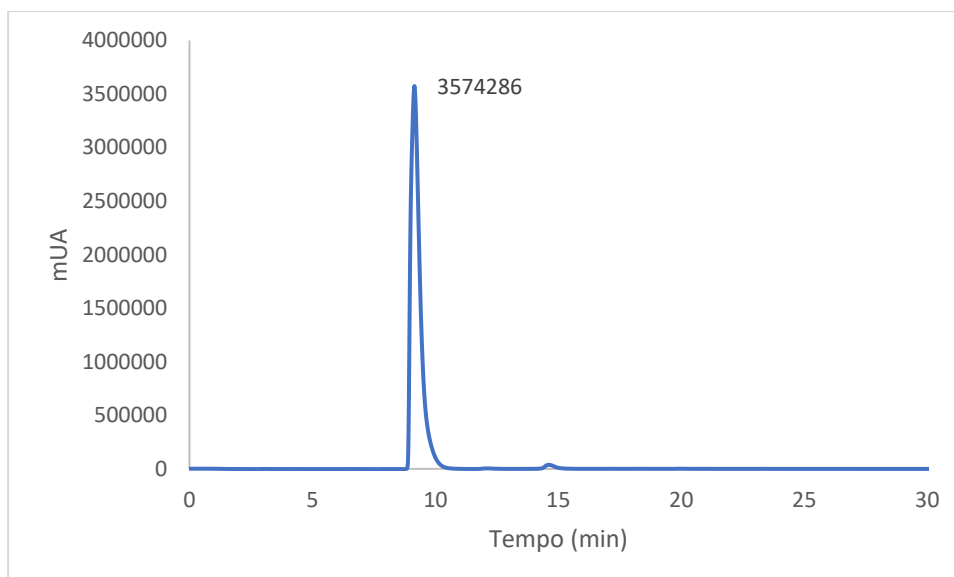


Figura 46 - Cromatograma do floroglucinol (5 mg/mL) a 265 nm.

1.9. Quantificação de floroglucinol nos extratos de algas

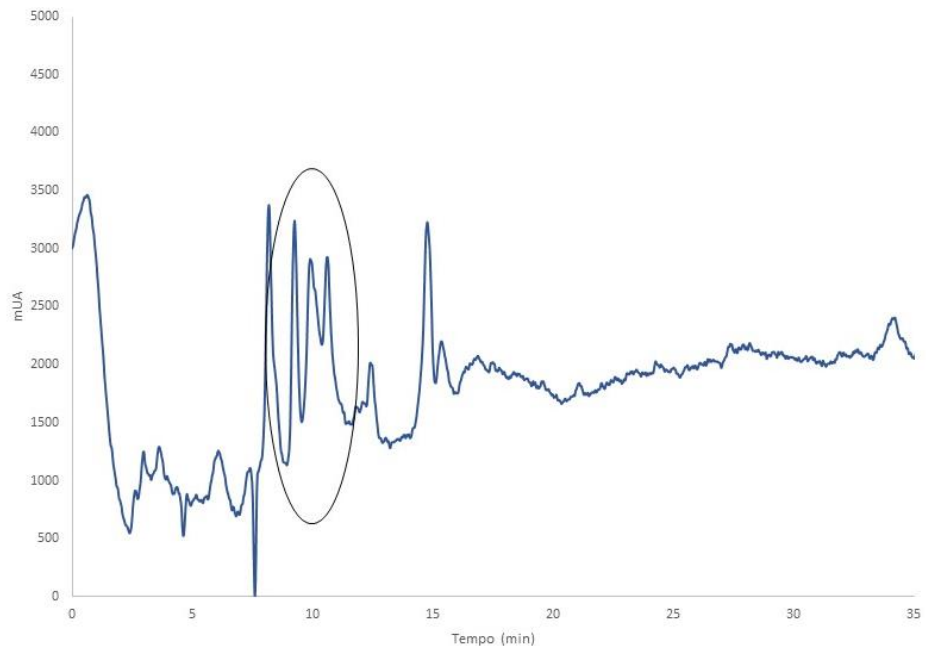


Figura 47 - Cromatograma obtido para o extrato de Aramé, para um comprimento de onda de 265 nm.

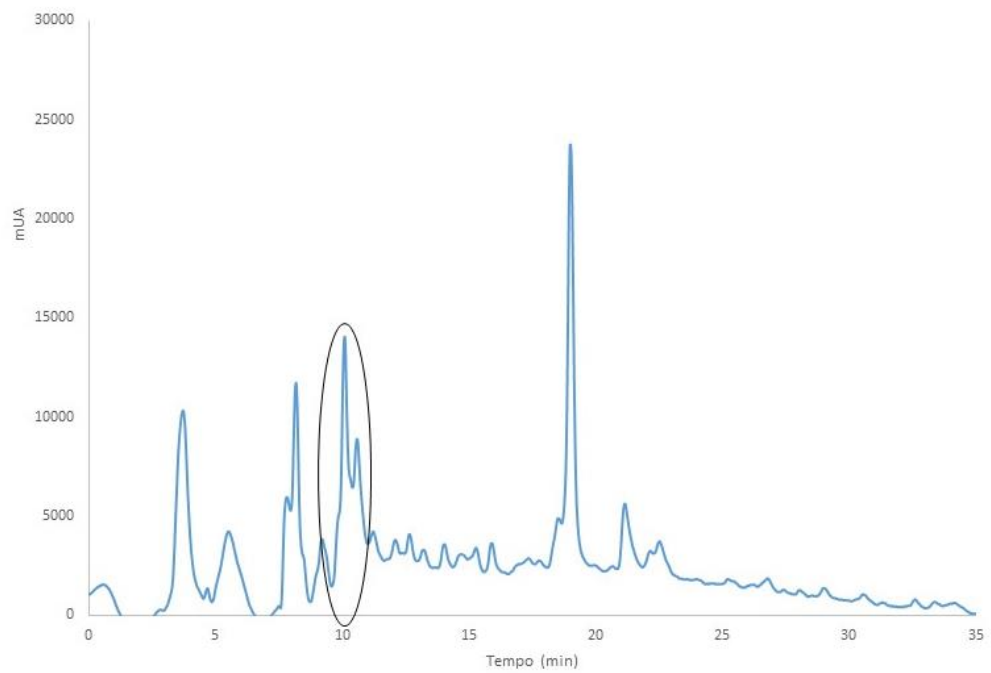


Figura 48 - Cromatograma obtido para o extrato de Nori, para um comprimento de onda de 265 nm.

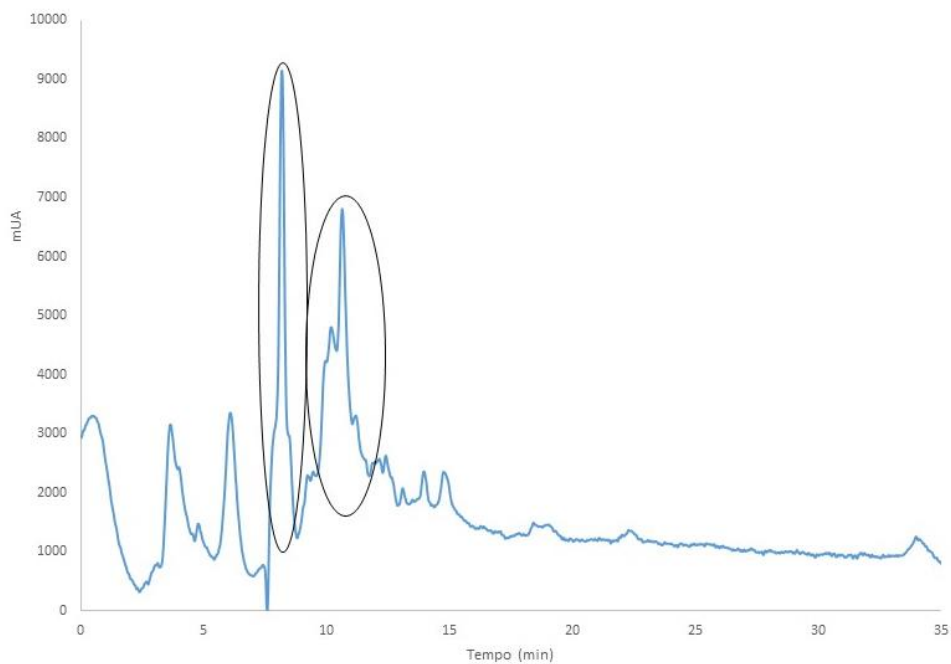


Figura 49 - Cromatograma obtido para o extrato de Fucus, para um comprimento de onda de 265 nm.

2. Determinação das Atividades Biológicas

2.1. Citotoxicidade nas células Hep-G2 e Caco-2

2.1.1. Hep-G2

Tabela 3 - Resultados obtidos para a citotoxicidade em células HepG2.

Extrato	Citotoxicidade 0,5 mg/mL (%)	Citotoxicidade 1 mg/mL (%)
Aramé	12±1	-7±1
Aramé metanol	-13±3	-16±2
Aramé água	7±1	2,7±0,1
Nori	31±1	34±3
Nori metanol	19±1	31±5
Nori água	11±2	12±2
Fucus	6±1	7,3±0,4

2.1.2. Caco-2

Tabela 4 - Resultados obtidos para a citotoxicidade em células Caco-2.

Extrato	Citotoxicidade 0,5 mg/mL (%)	Citotoxicidade 1 mg/mL (%)
Aramé	13±2	14±3
Aramé metanol	28±3	39±1
Aramé água	6,3±0,5	11±4
Nori	22±2	28±2
Nori metanol	4,7±0,6	24±2
Nori água	7±2	-41±3
Fucus	29±3	44±4

2.2. Atividade Antioxidante – EC₅₀

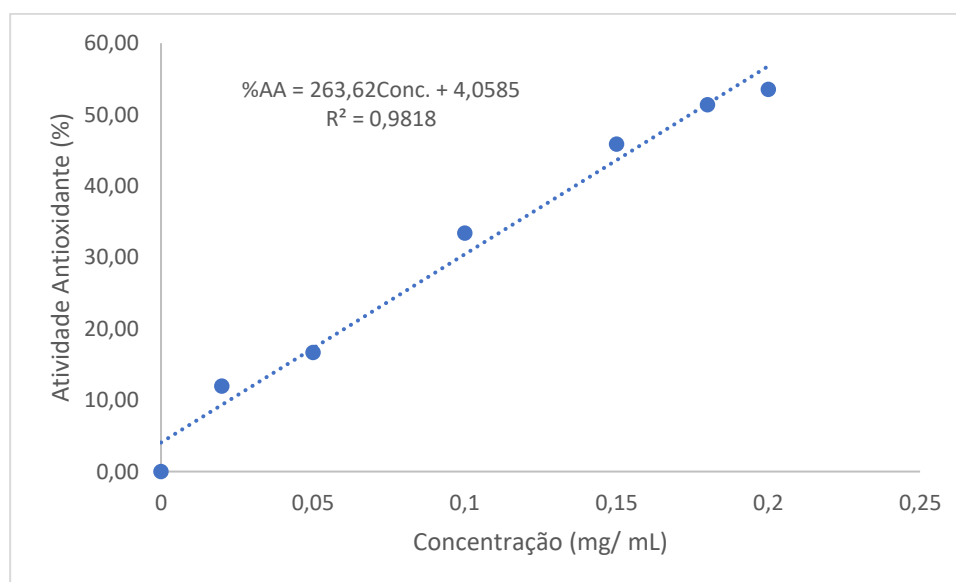


Figura 50 - Retra de calibração para determinar o EC₅₀ do extrato de Aramé não purificado.

2.3. Inibição da Acetilcolinesterase

2.3.1. 1º passo – velocidade do enzima

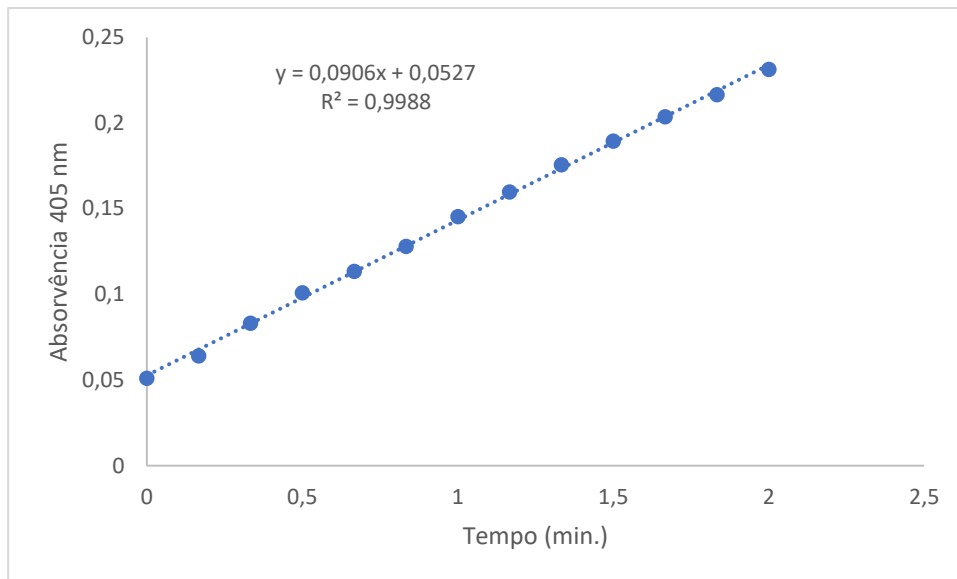


Figura 51 - Determinação da velocidade inicial do enzima AChE, na ausência de extrato.

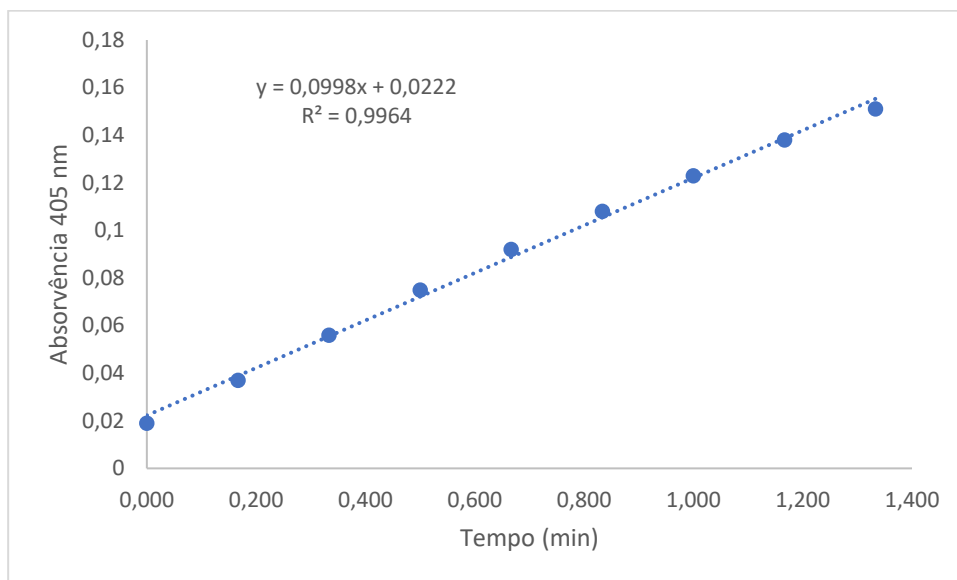


Figura 52 - Determinação da velocidade inicial do enzima AChE para o floroglucinol.

2.3.2. 2º passo – Atividade do enzima na presença de Aramé

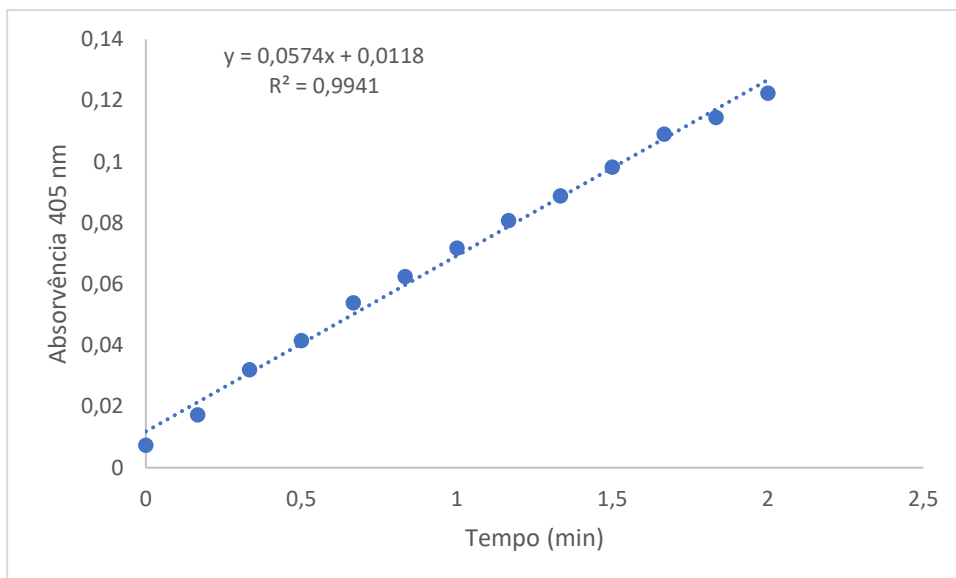


Figura 53 - Atividade do enzima na presença de Aramé - ensaio 1.

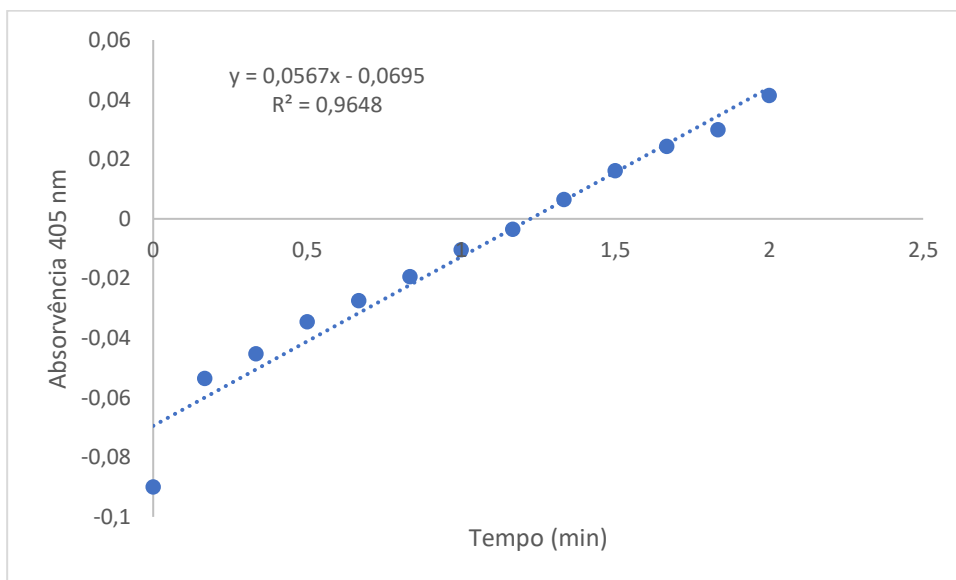


Figura 54 - Atividade do enzima na presença de Aramé - ensaio 2.

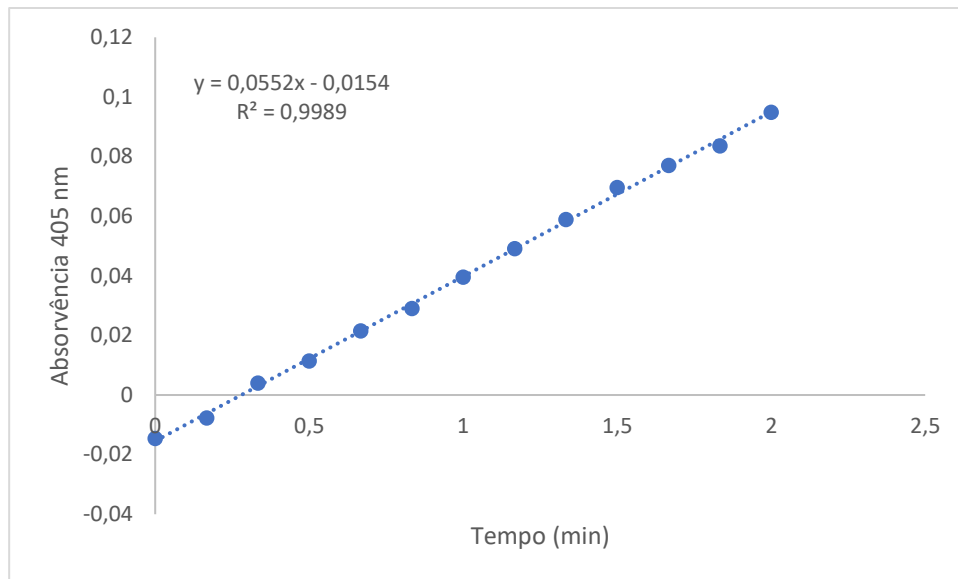


Figura 55 - Atividade do enzima na presença de Aramé - ensaio 3.

2.3.3. 2º passo – Atividade do enzima na presença de Nori

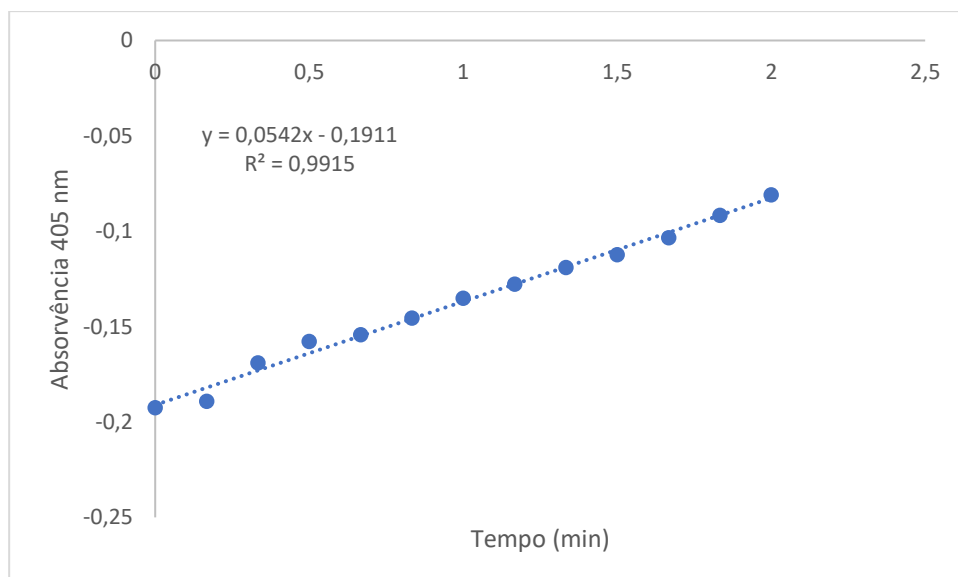


Figura 56 - Atividade do enzima na presença de Nori - ensaio 1.

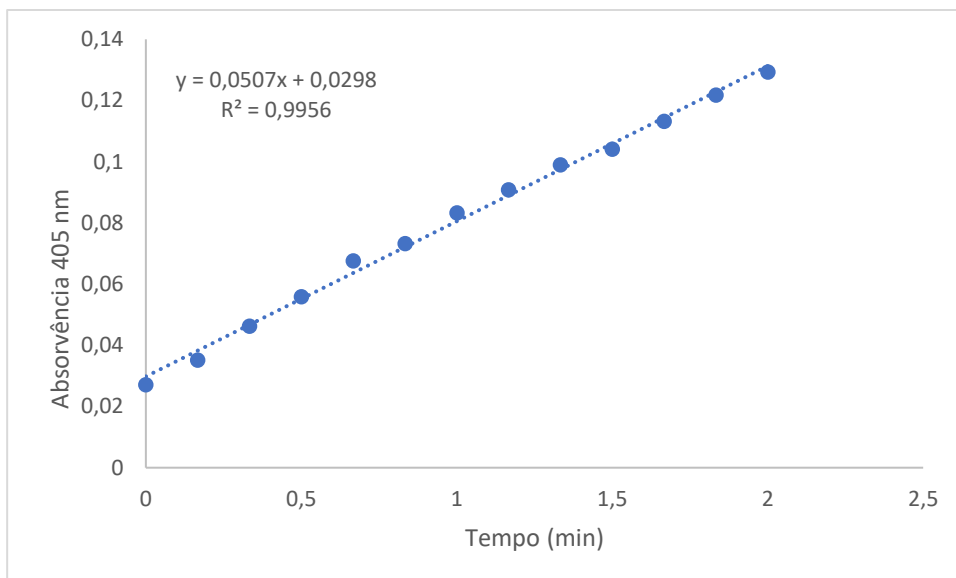


Figura 57 - Atividade do enzima na presença de Nori - ensaio 2.

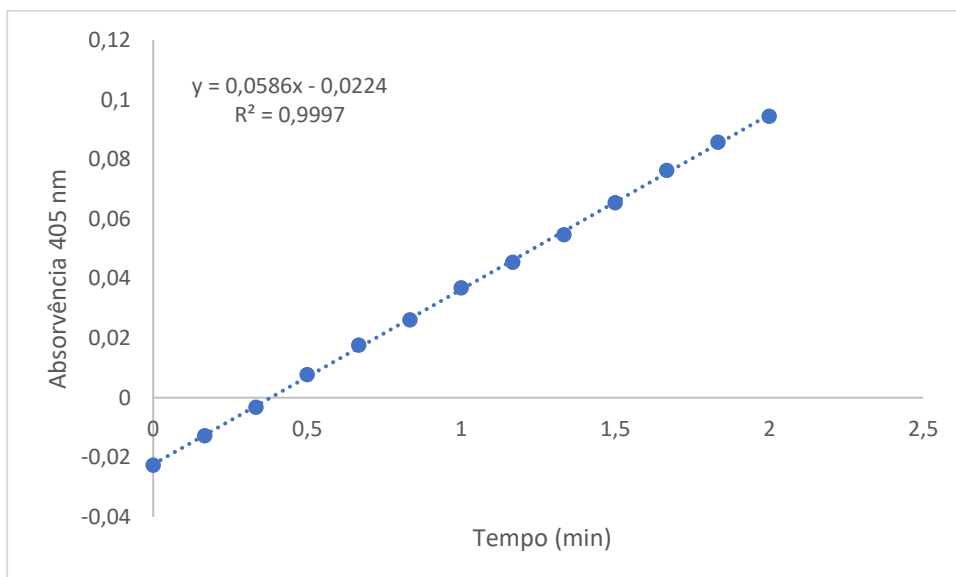


Figura 58 - Atividade do enzima na presença de Nori - ensaio 3.

2.3.4. 2º passo – Atividade do enzima na presença de Fucus

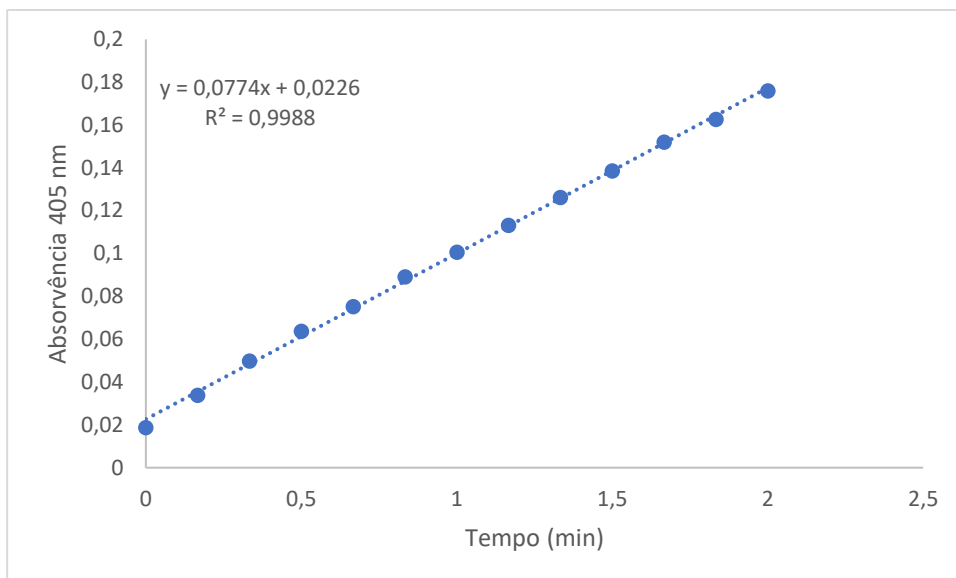


Figura 59 - Atividade do enzima na presença de Fucus - ensaio 1.

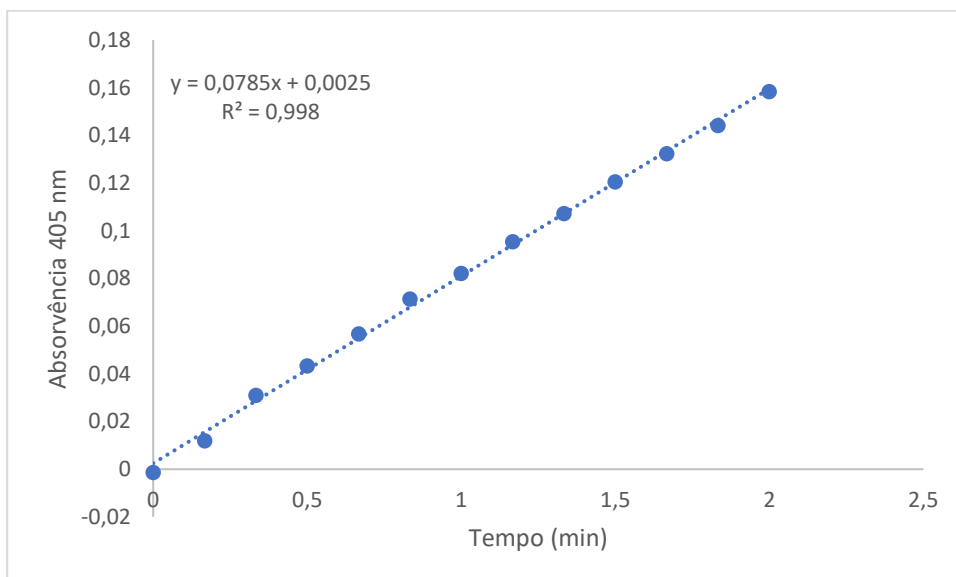


Figura 60 - Atividade do enzima na presença de Fucus - ensaio 2.

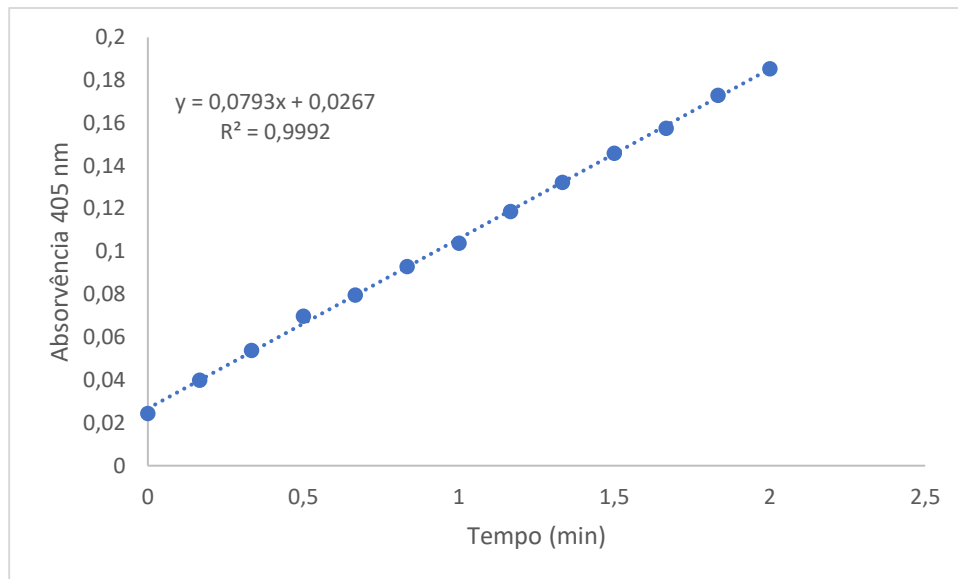


Figura 61 - Atividade do enzima na presença de Fucus - ensaio 3.

2.3.5. 2º passo – Atividade do enzima na presença de floroglucinol

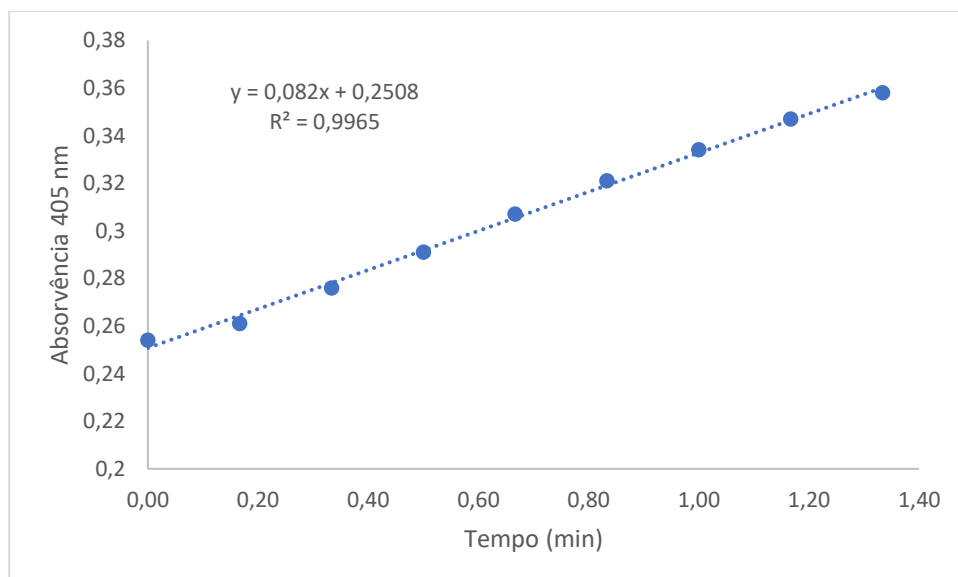


Figura 62 - Atividade do enzima na presença de floroglucinol - ensaio 1.

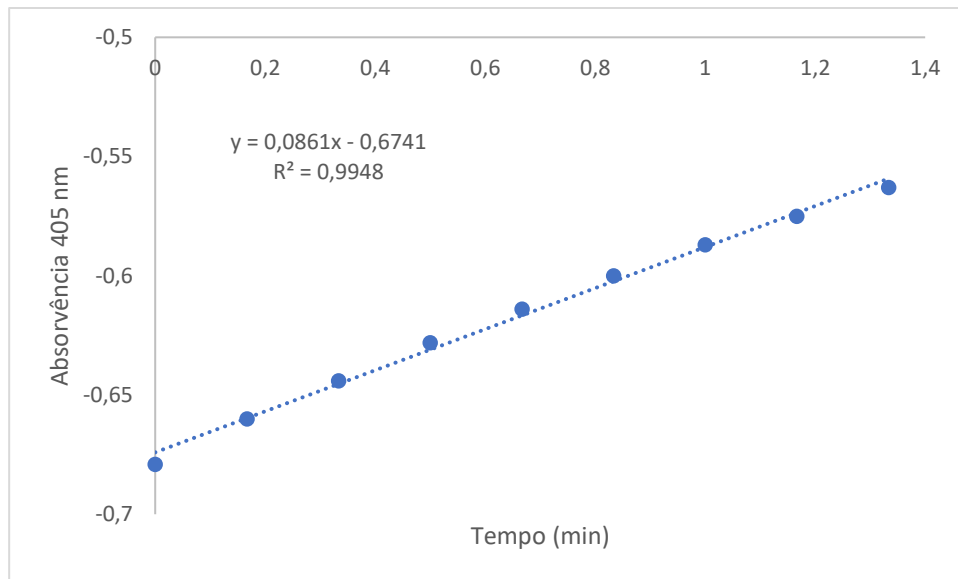


Figura 63 - Atividade do enzima na presença de floriglucinol - ensaio 2.

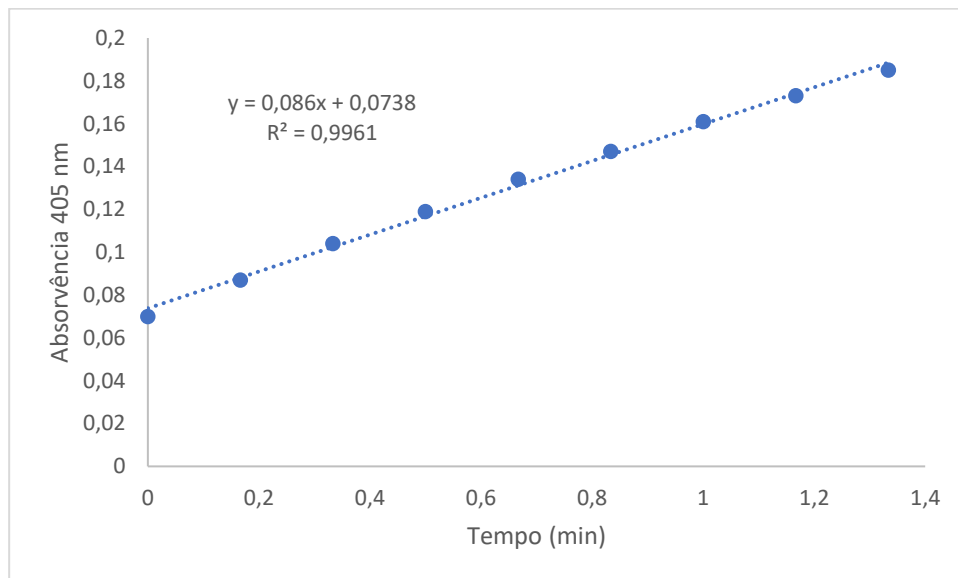


Figura 64 - Atividade do enzima na presença de floriglucinol - ensaio 3.

2.4. Inibição da HMGR

2.4.1. 1º passo – velocidade do enzima

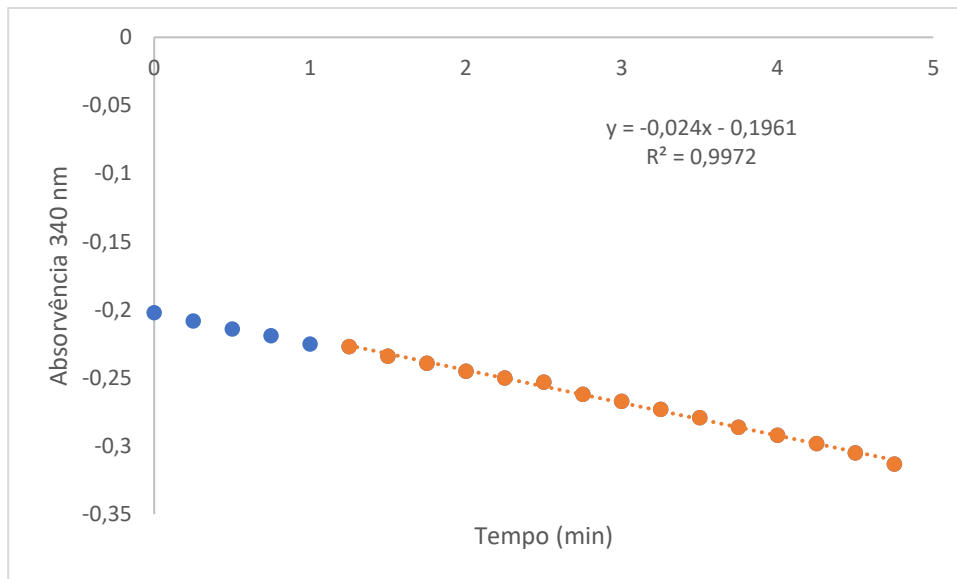


Figura 65 - Determinação da velocidade inicial do enzima HMGR, na ausência de extrato ou inibidor padrão, para a Aramé.

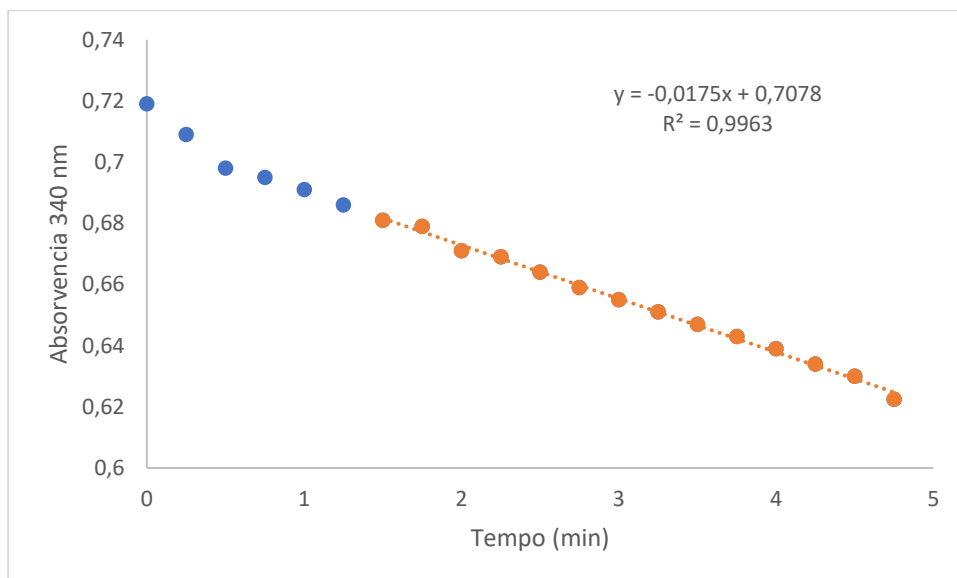


Figura 66 - Determinação da velocidade inicial do enzima HMGR, na ausência de extrato ou inibidor padrão, para a Nori e o Fucus.

2.4.2. 2º passo – Atividade do enzima na presença do inibidor padrão, pravastatina

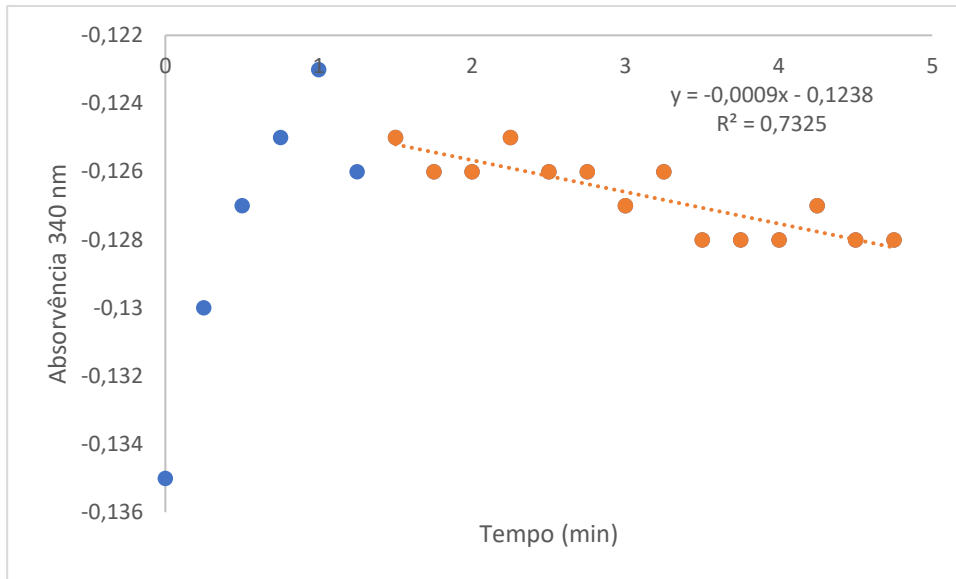


Figura 67 - Atividade do enzima na presença de pravastatina - ensaio 1.

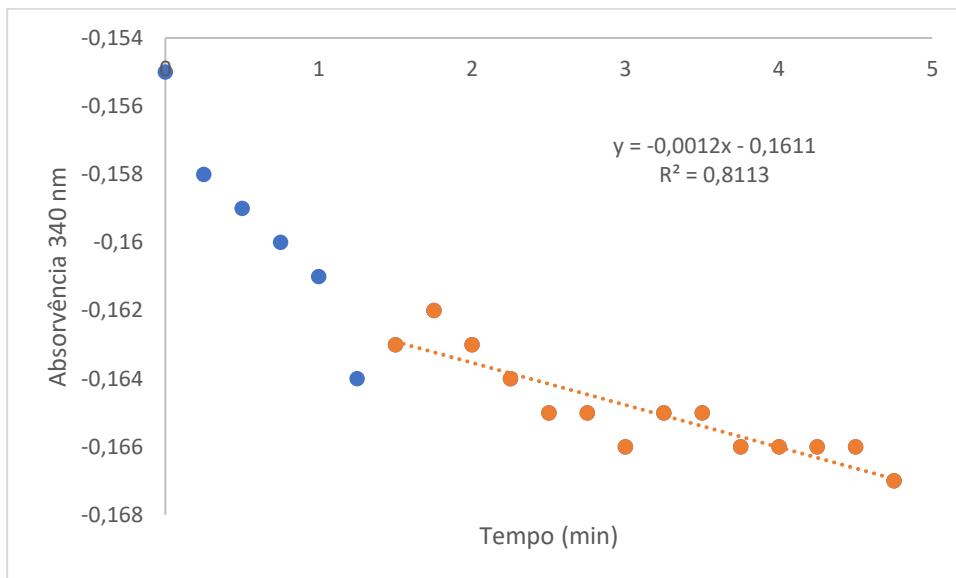


Figura 68 - Atividade do enzima na presença de pravastatina - ensaio 2.

2.4.3. 2º passo – Atividade do enzima na presença da Aramé

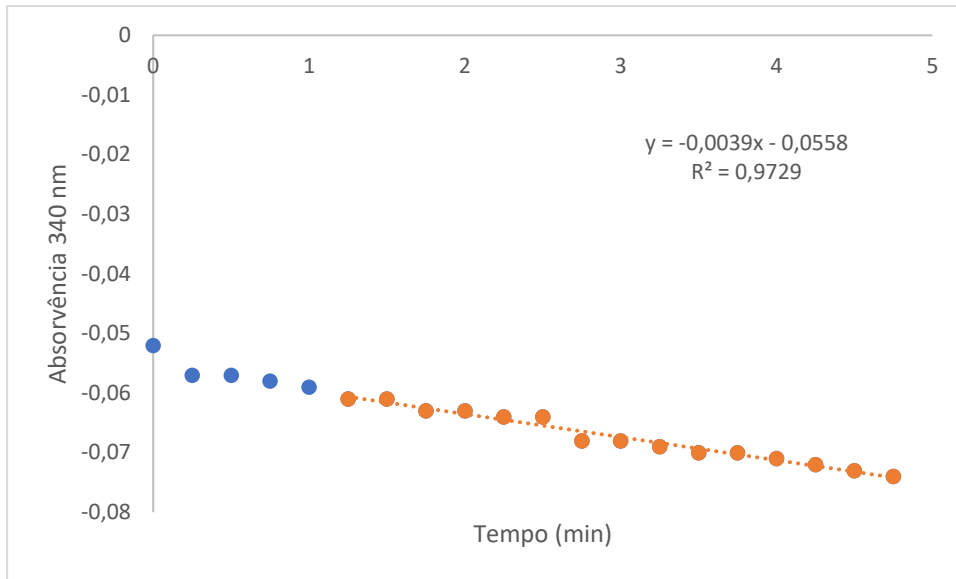


Figura 69 - Atividade do enzima na presença de Aramé - ensaio 1.

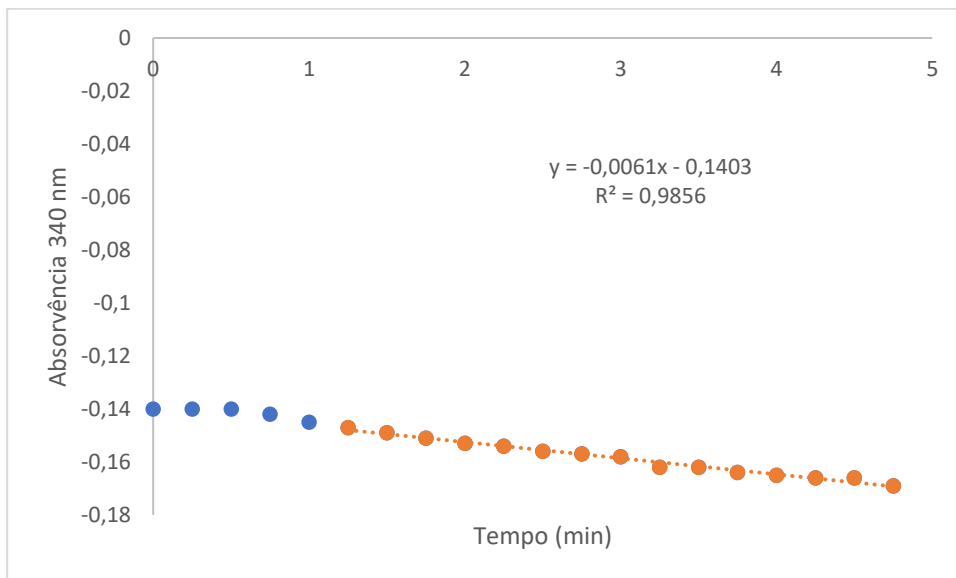


Figura 70 - Atividade do enzima na presença de Aramé - ensaio 2.

2.4.4. 2º passo – Atividade do enzima na presença da Nori

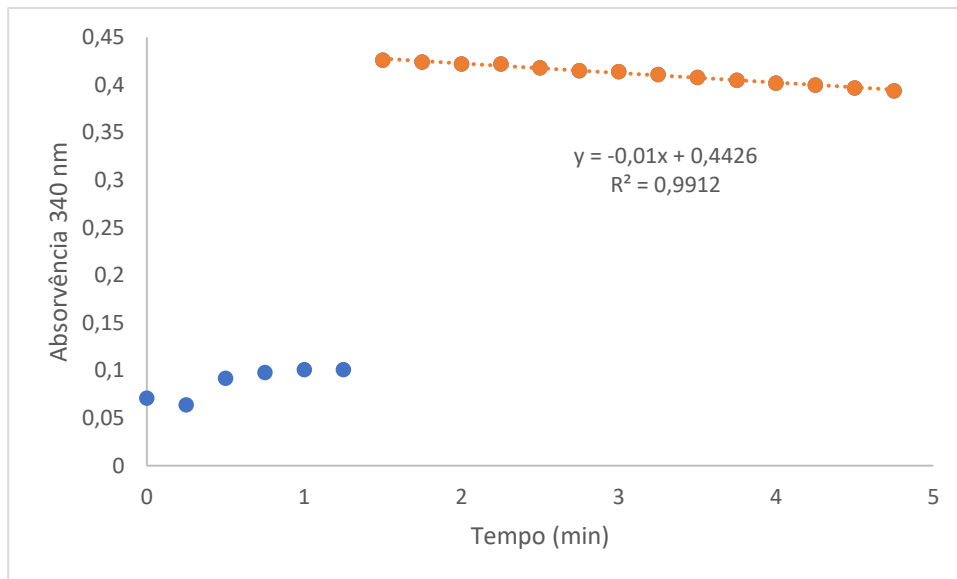


Figura 71 - Atividade do enzima na presença de Nori - ensaio 1.

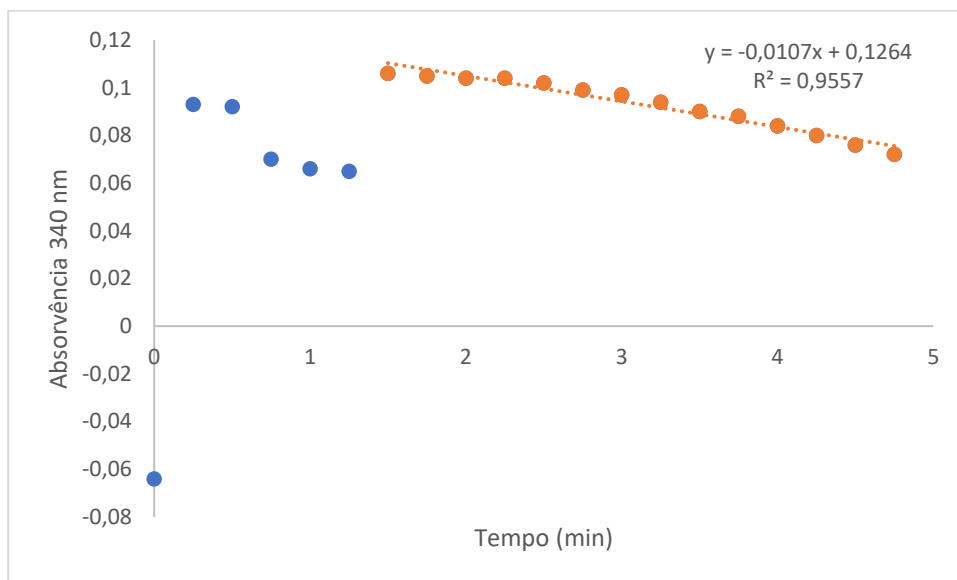


Figura 72 - Atividade do enzima na presença de Nori - ensaio 2.

2.4.5. 2º passo – Atividade do enzima na presença do Fucus

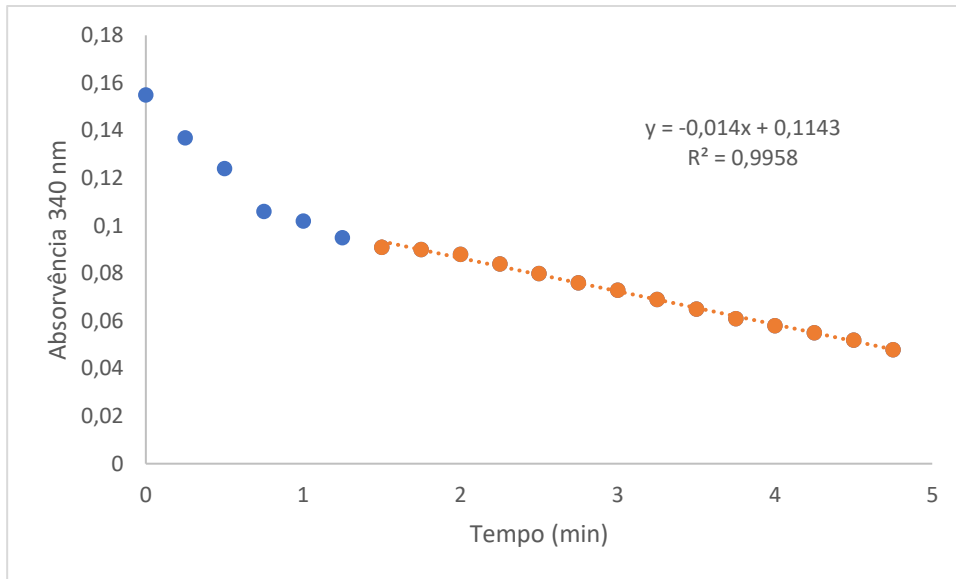


Figura 73 - Atividade do enzima na presença de Fucus - ensaio 1.

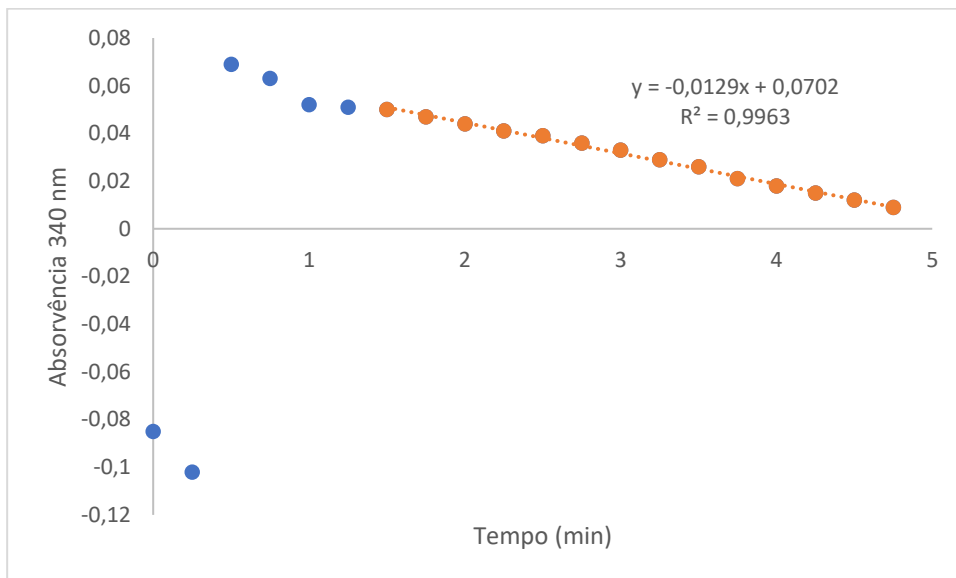


Figura 74 - Atividade do enzima na presença de Fucus - ensaio 2.

3. Ensaios em linhas celulares de Caco-2 e HepG2

3.1. Efeito da ação dos extratos das algas na barreira gastrointestinal

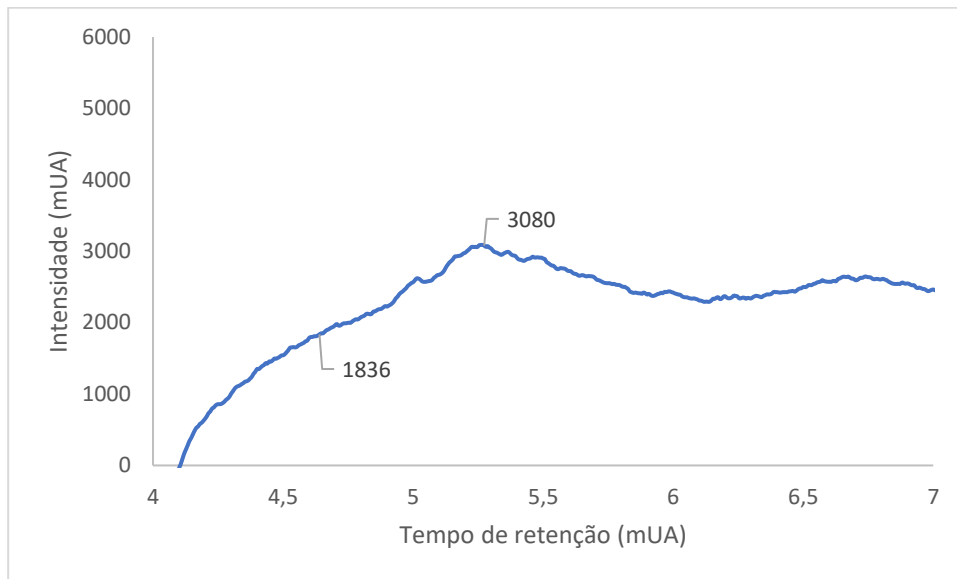


Figura 75 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na ausência das algas comestíveis e ezetimiba.

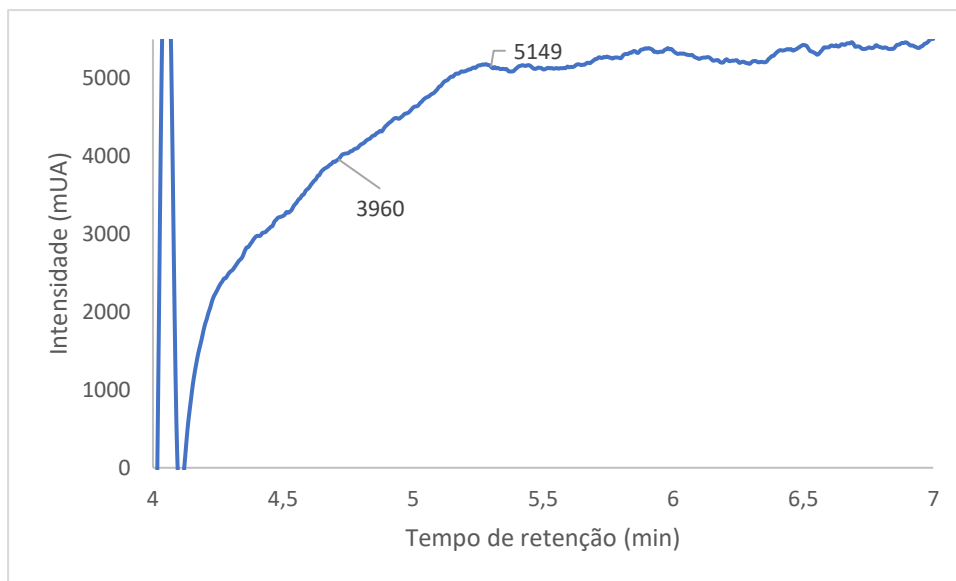


Figura 76 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na ausência das algas comestíveis e ezetimiba.

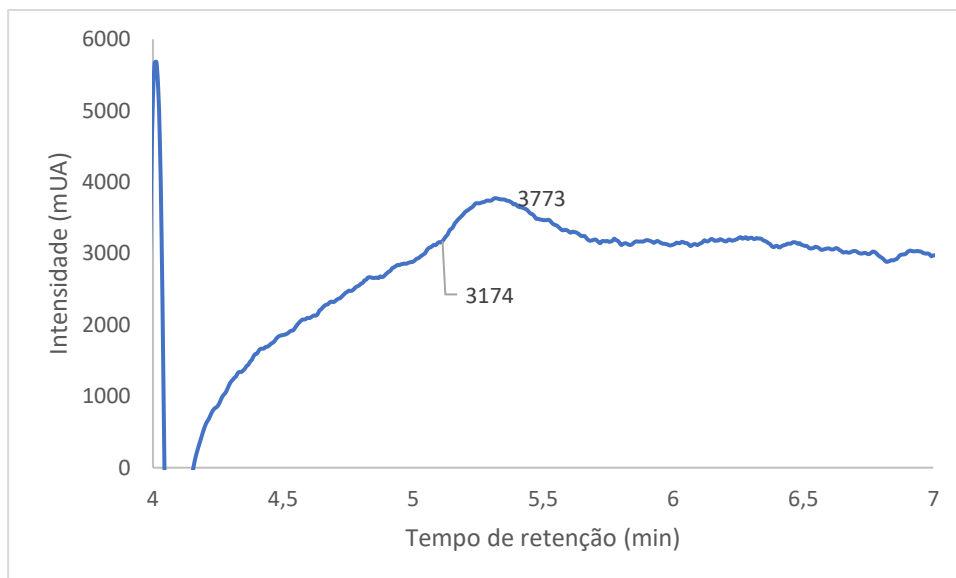


Figura 77 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na presença de ezetimiba.

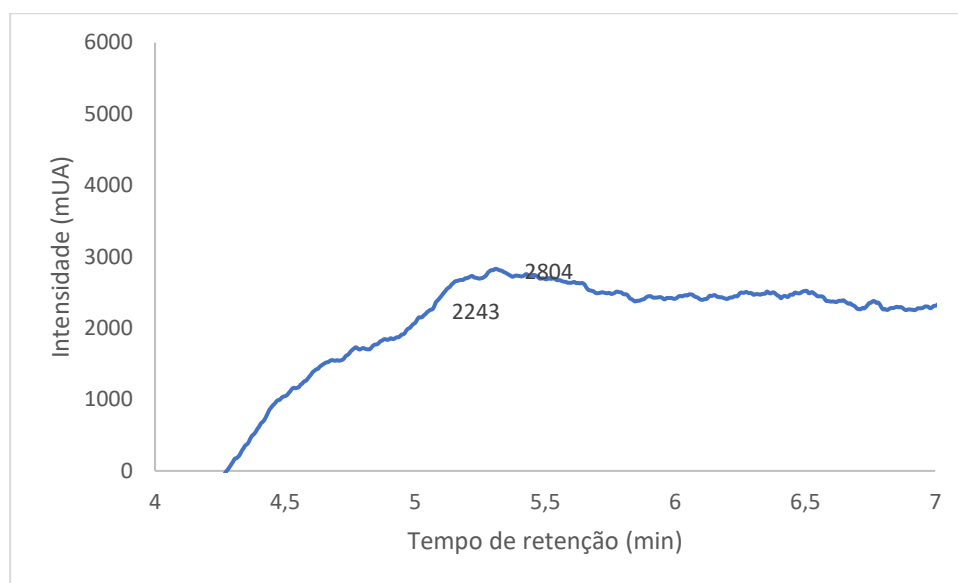


Figura 78 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na presença de ezetimiba.

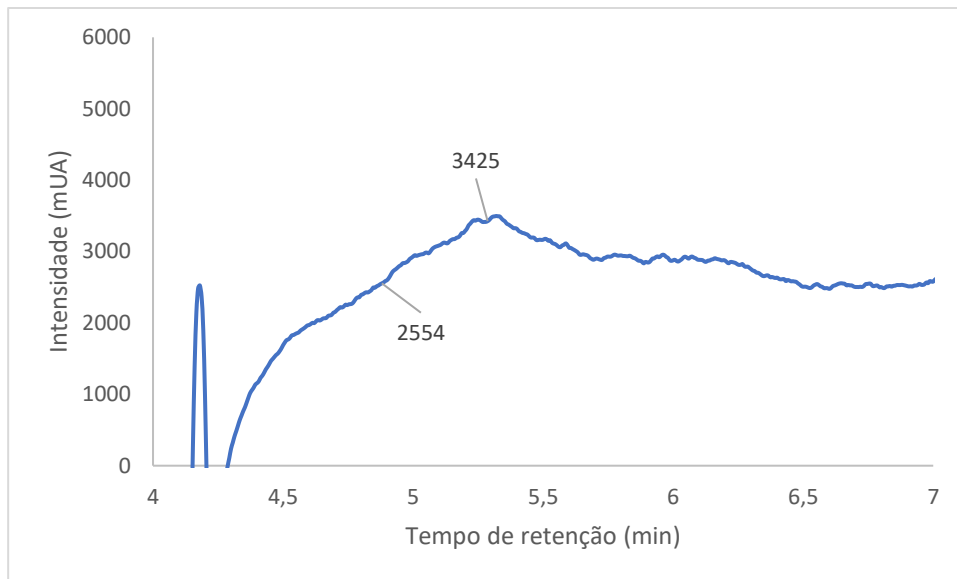


Figura 79 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, apenas na presença da Nori.

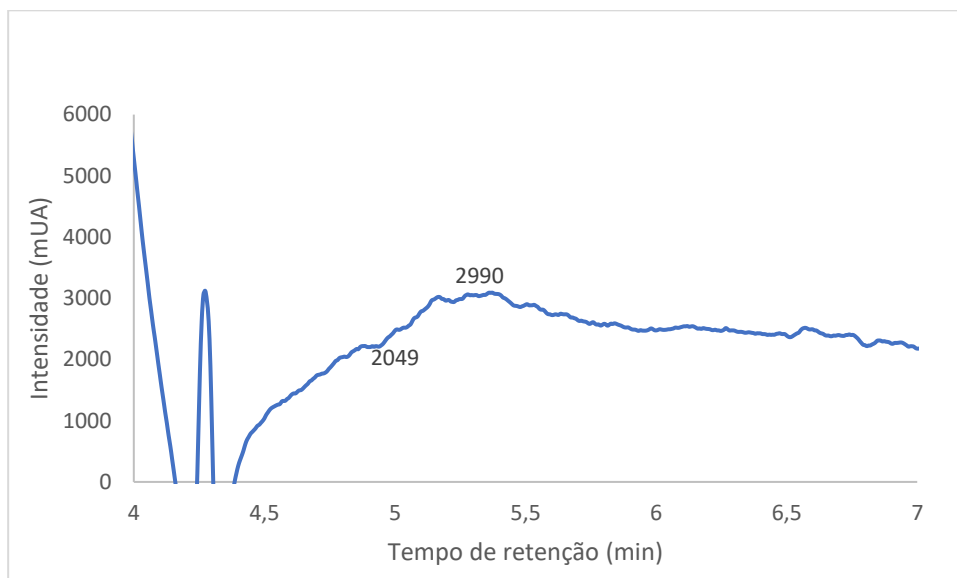


Figura 80 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, apenas na presença da Nori.

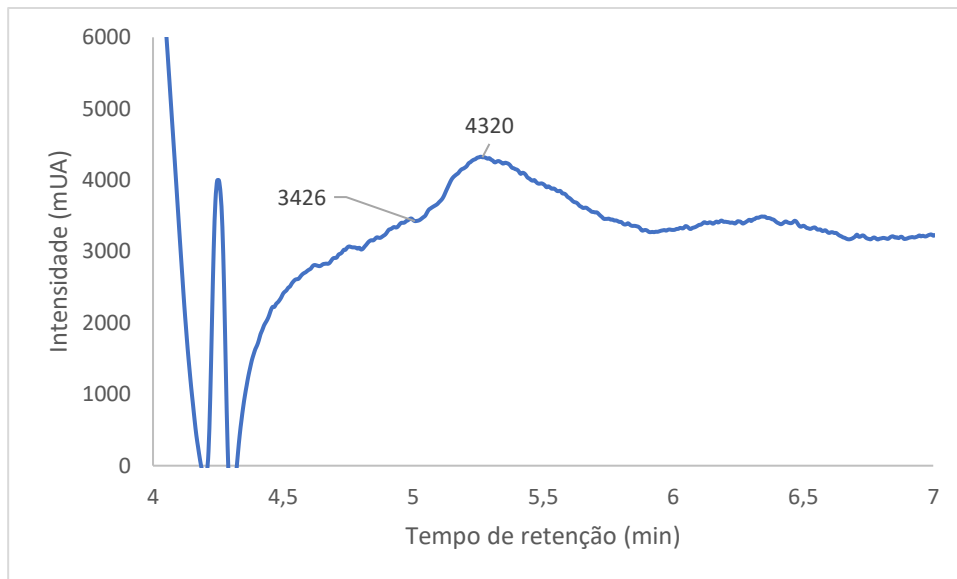


Figura 81 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na presença da Nori e da ezetimiba.

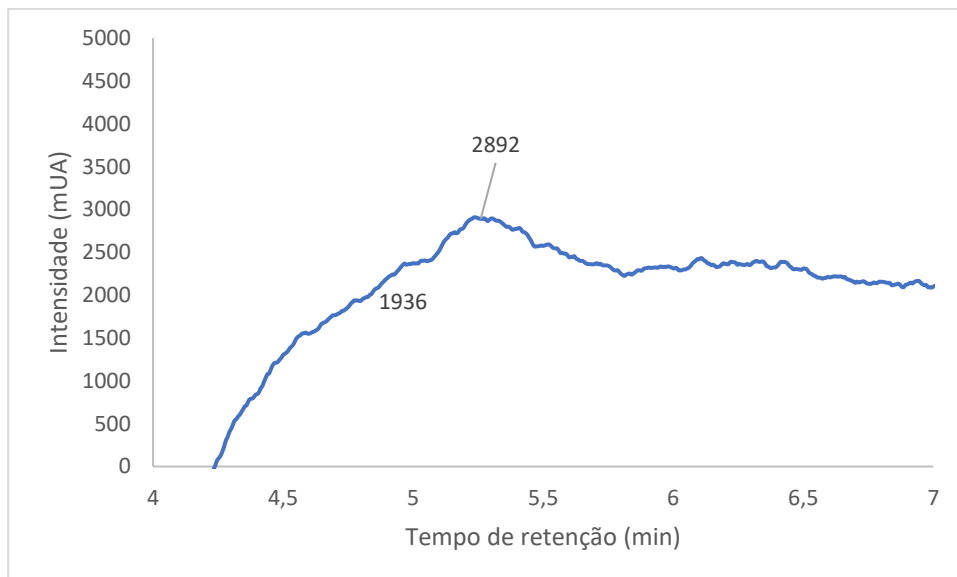


Figura 82 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na presença da Nori e da ezetimiba.

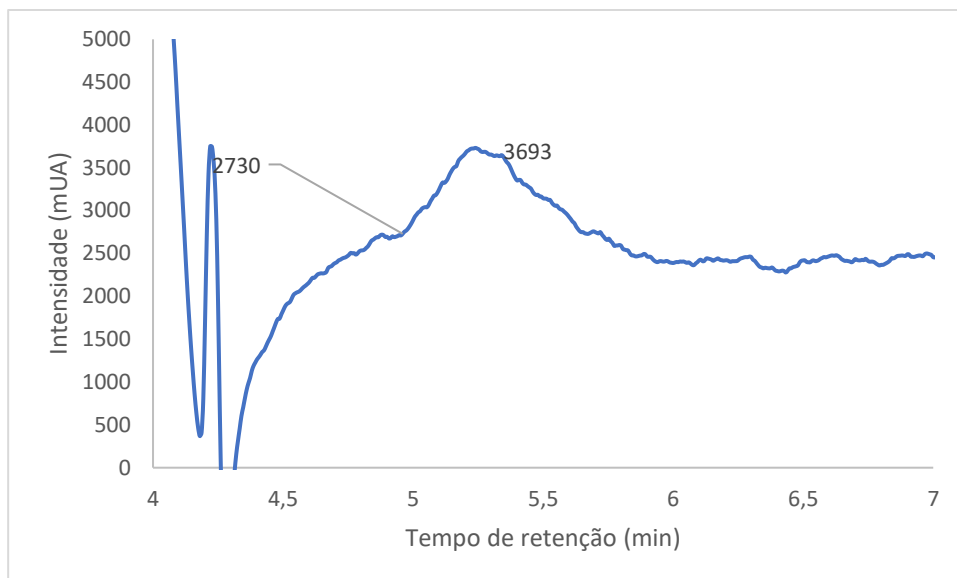


Figura 83 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, apenas na presença do Fucus.

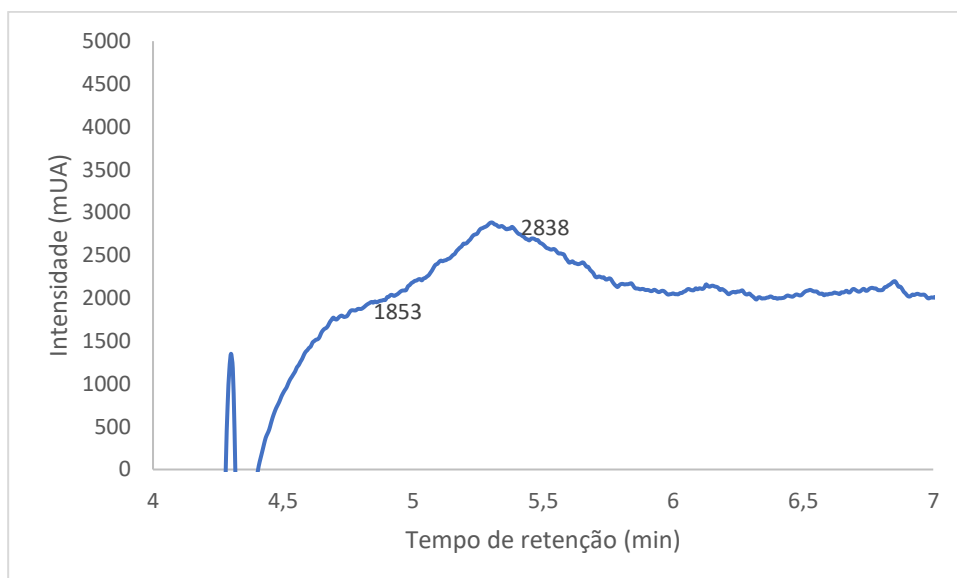


Figura 84 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, apenas na presença do Fucus.

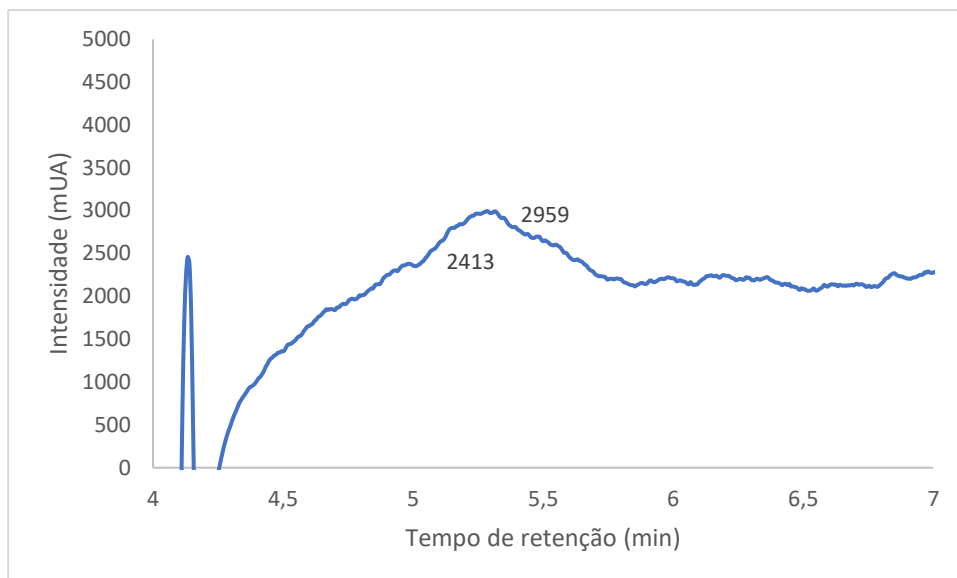


Figura 85 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na presença do Fucus e da ezetimiba.

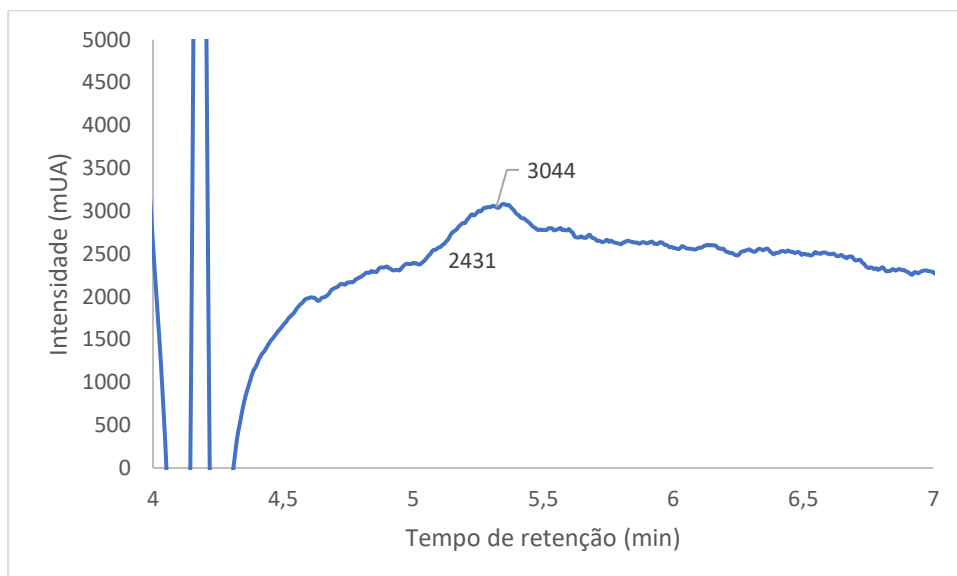


Figura 86 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, na presença do Fucus e da ezetimiba.

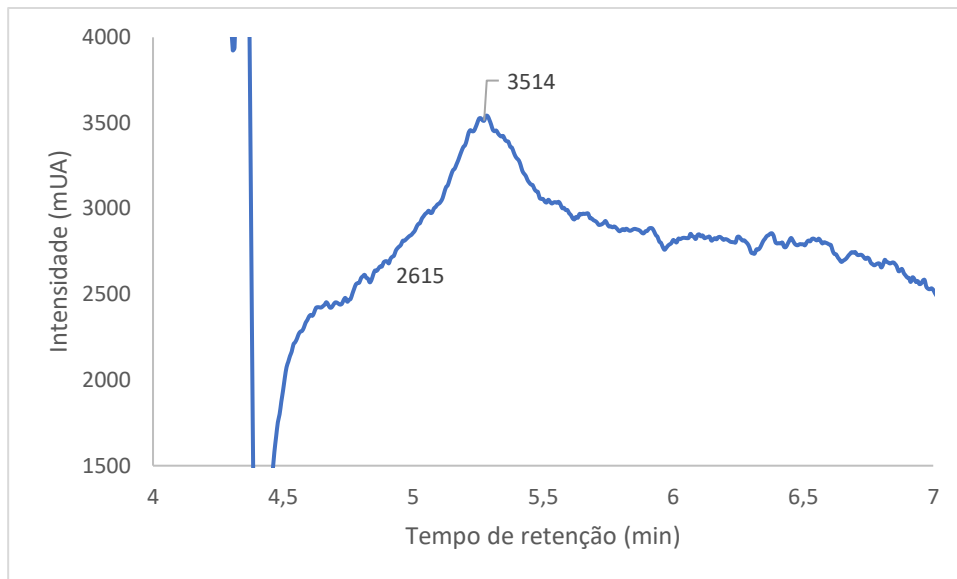


Figura 87 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, apenas na presença da Aramé.

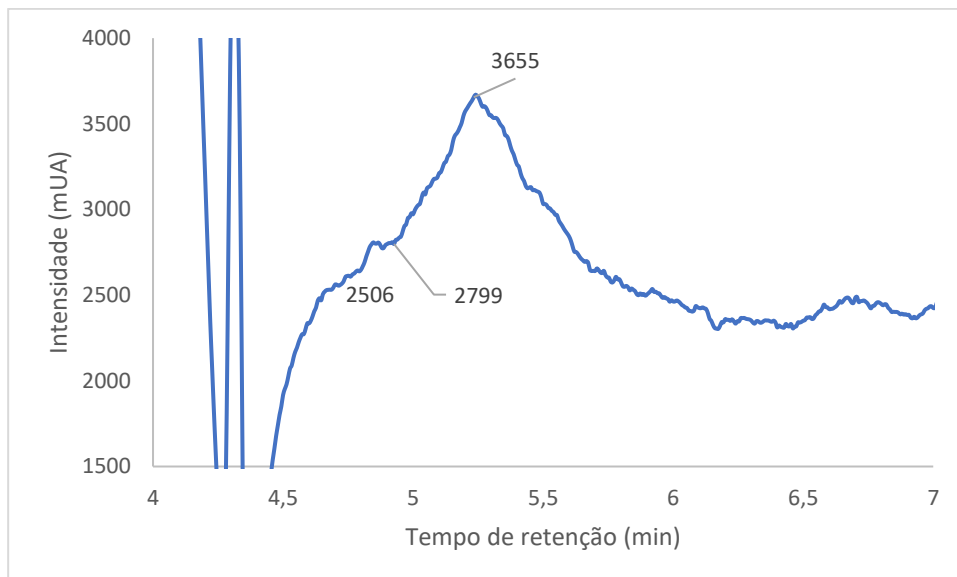


Figura 88 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, apenas na presença da Aramé.

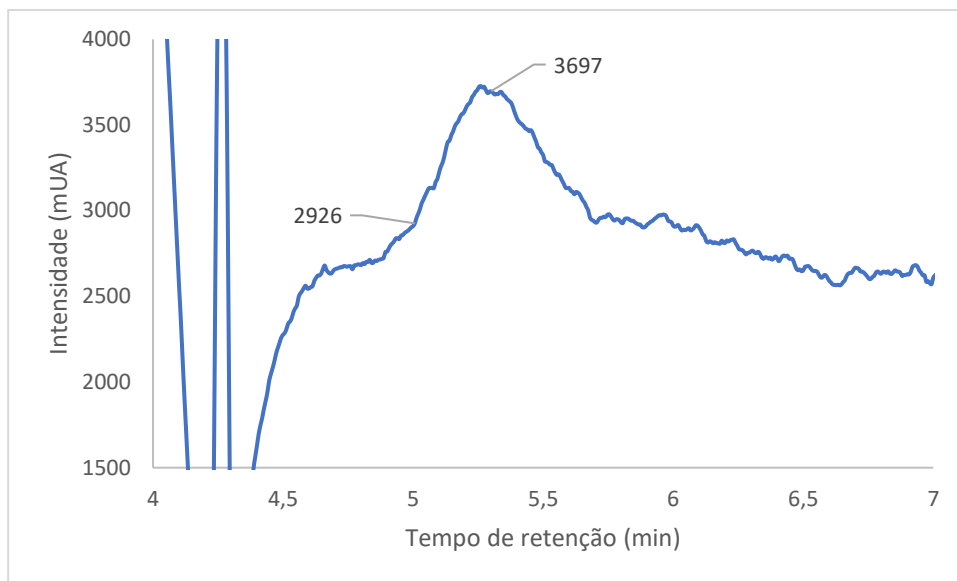


Figura 89 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, presença da Aramé e da ezetimiba.

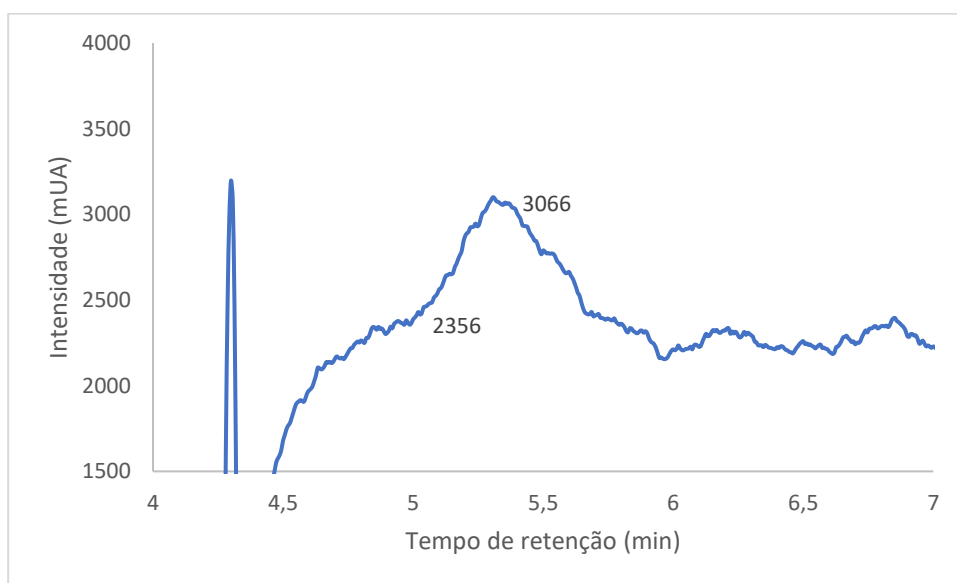


Figura 90 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do colesterol, ao fim das 6 horas, presença da Aramé e da ezetimiba.

Tabela 5 - Resultados obtidos para a permeação e redução da permeação do colesterol na presença da Aramé, Nori e Fucus e da Ezetimiba.

Algas	Amostra	Permeação Relativa (%)	Média permeação (%)	Redução Permeação (%)
-	Col	100	100	-
	Col+E	49,24	47,68	52±2
		46,12		

Nori	Col+N	71,60	74,48	26±4
		77,35		
	Col+N+E	73,49	76,29	24±4
		79,08		
Fucus	Col+F	79,16	80,07	20±1
		80,97		
	Col+F+E	44,88	47,59	52±4
		50,29		
Aramé	Col+A	73,90	72,14	28±2
		70,37		
	Col+A+E	63,38	60,87	39±4
		58,36		

3.2. Efeito dos compostos bioativos dos extratos de algas na permeação da barreira gastrointestinal

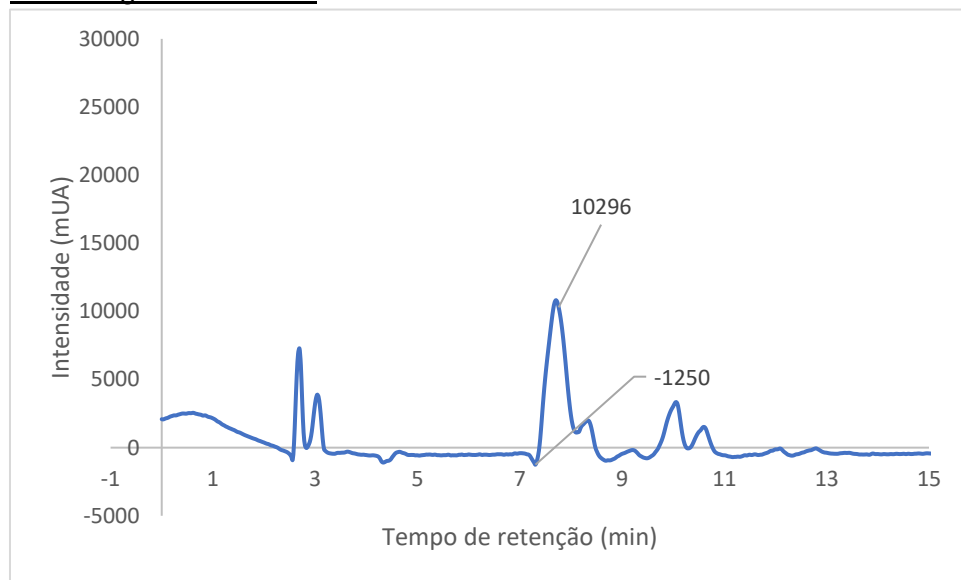


Figura 91 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação da Nori, ao fim das 6 horas.

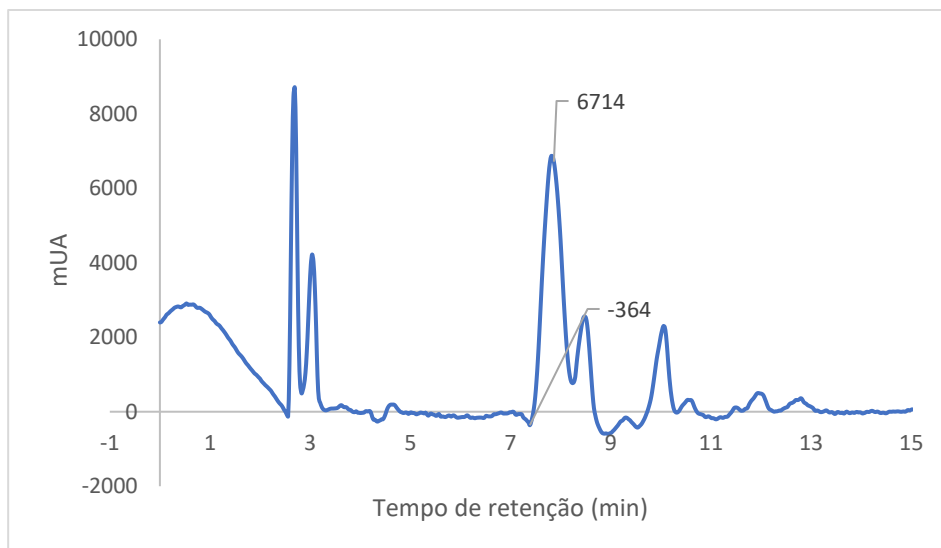


Figura 92 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação da Nori, ao fim das 6 horas.



Figura 93 -Cromatograma 1 para a determinação da permeação da Nori, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol.

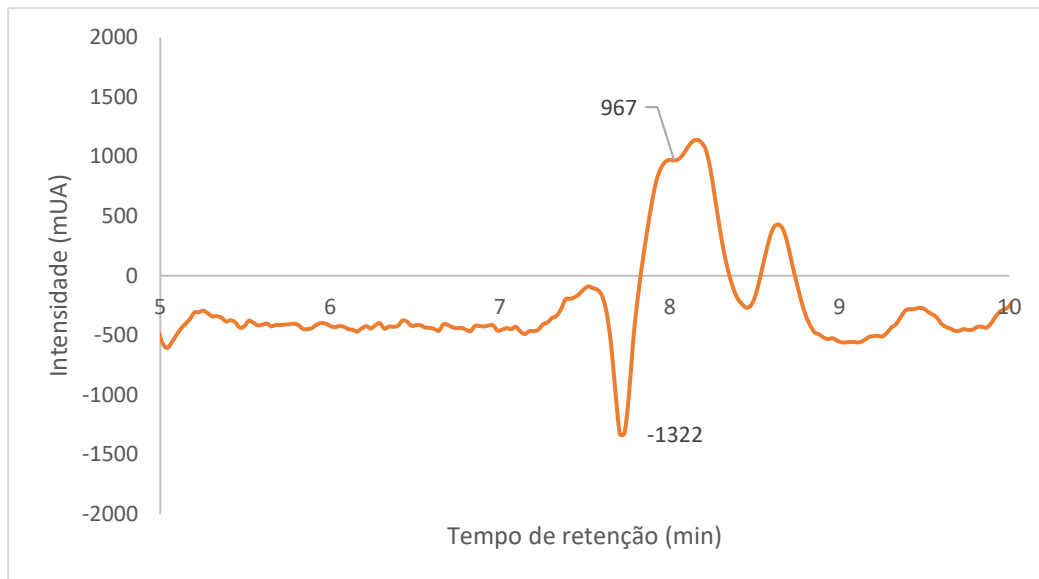


Figura 94 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação da Nori, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol.

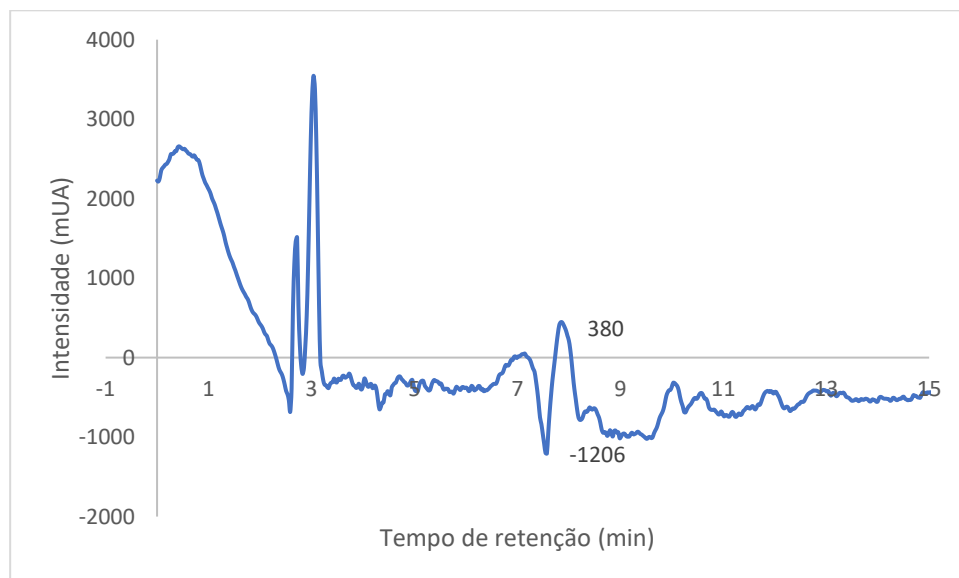


Figura 95 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação da Nori, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol e ezetimiba.

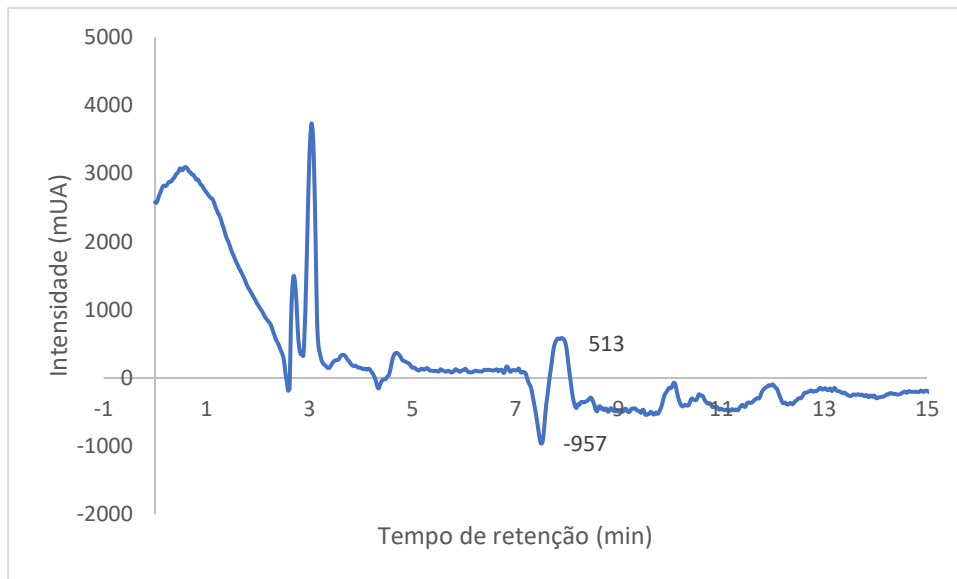


Figura 96 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação da Nori, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol e ezetimiba.

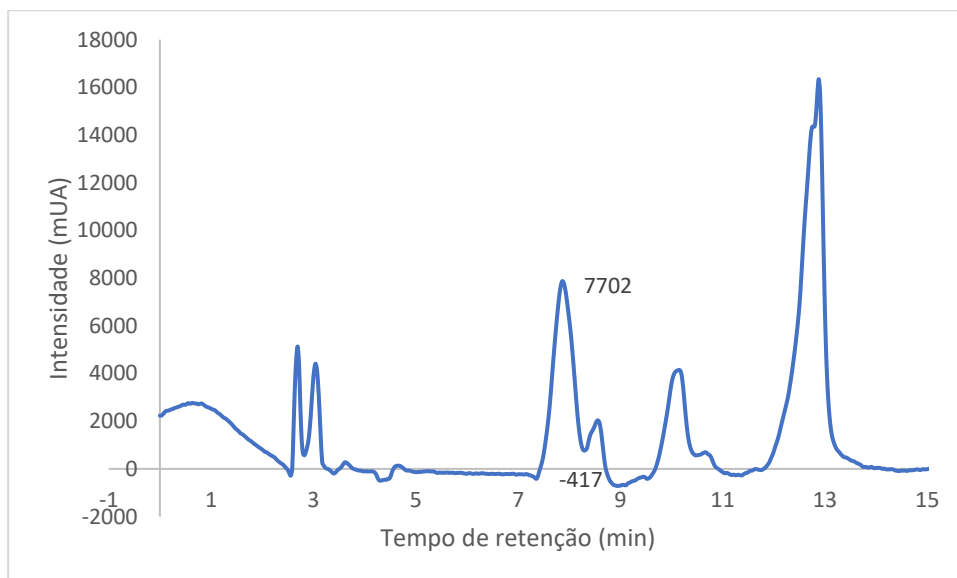


Figura 97 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do Fucus, ao fim das 6 horas.

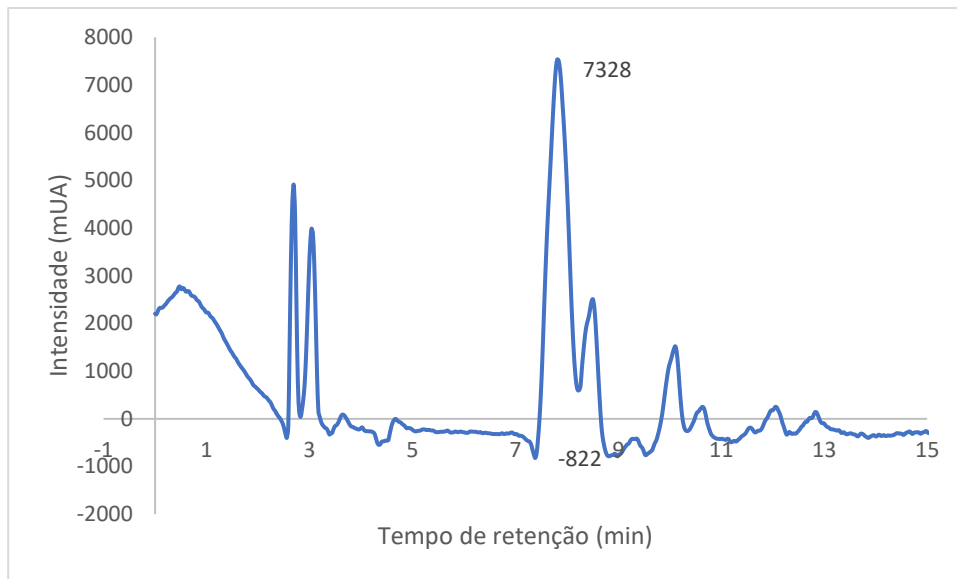


Figura 98 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do Fucus, ao fim das 6 horas.

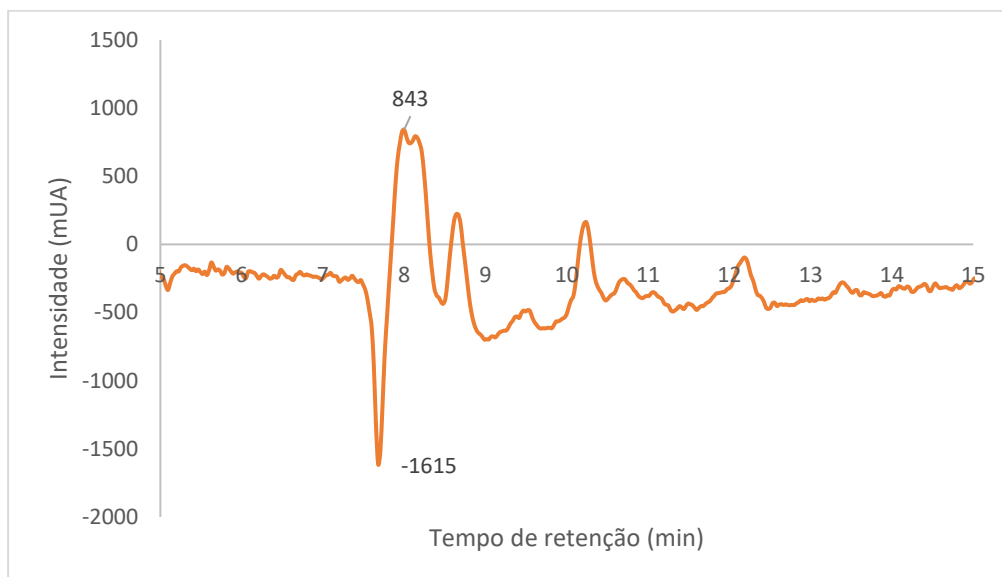


Figura 99 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do Fucus, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol.



Figura 100 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do Fucus, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol.

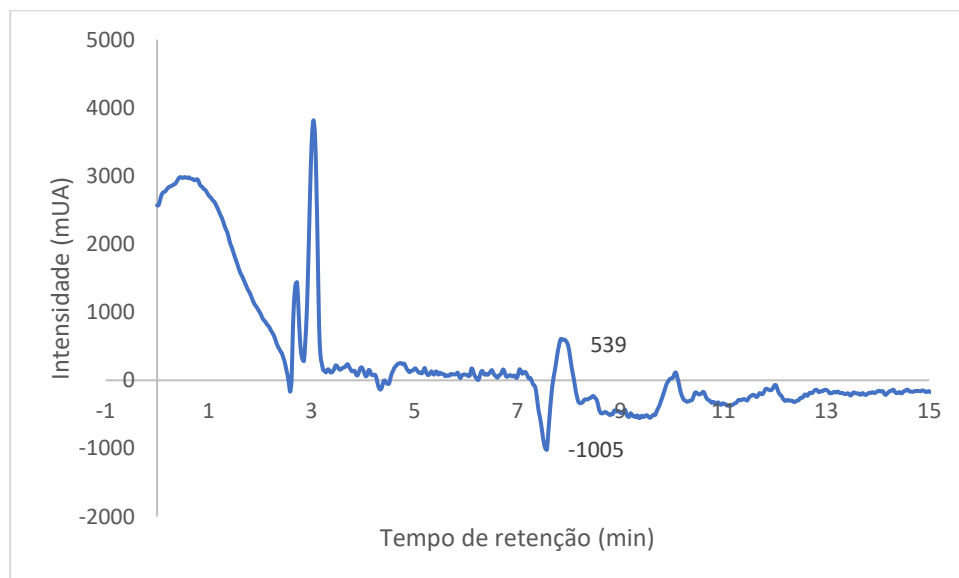


Figura 101 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação do Fucus, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol e ezetimiba.

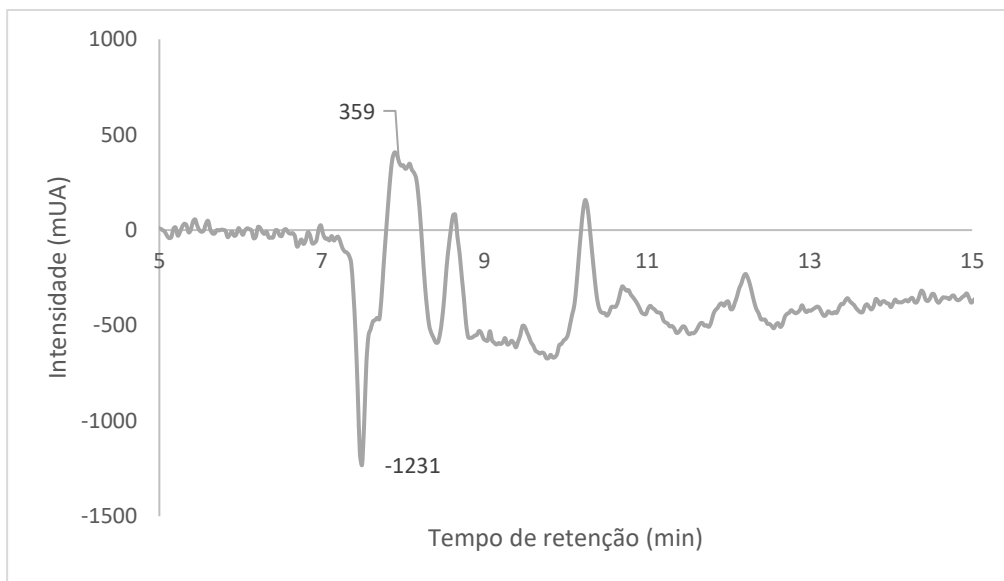


Figura 102 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação do Fucus, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol e ezetimiba.

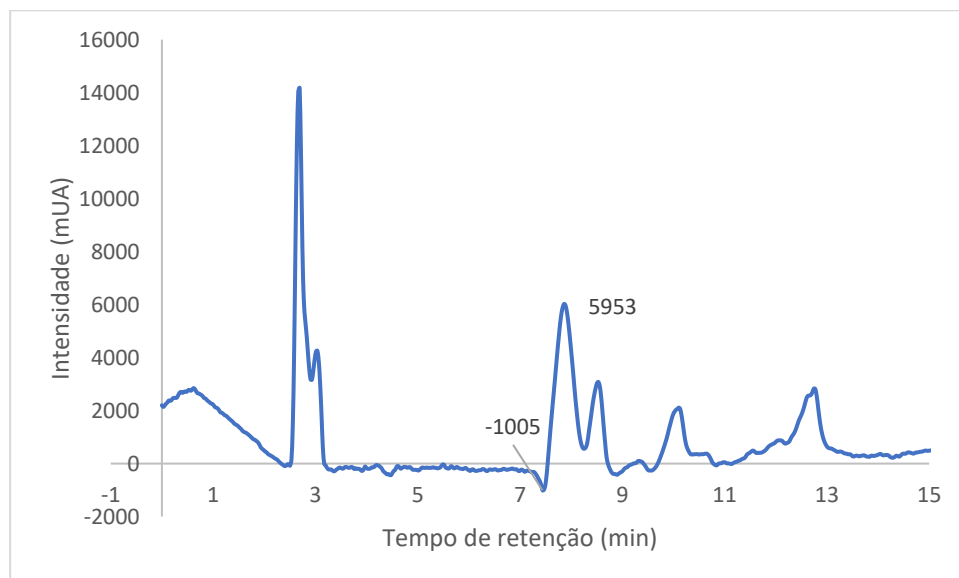


Figura 103 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação da Aramé, ao fim das 6 horas.

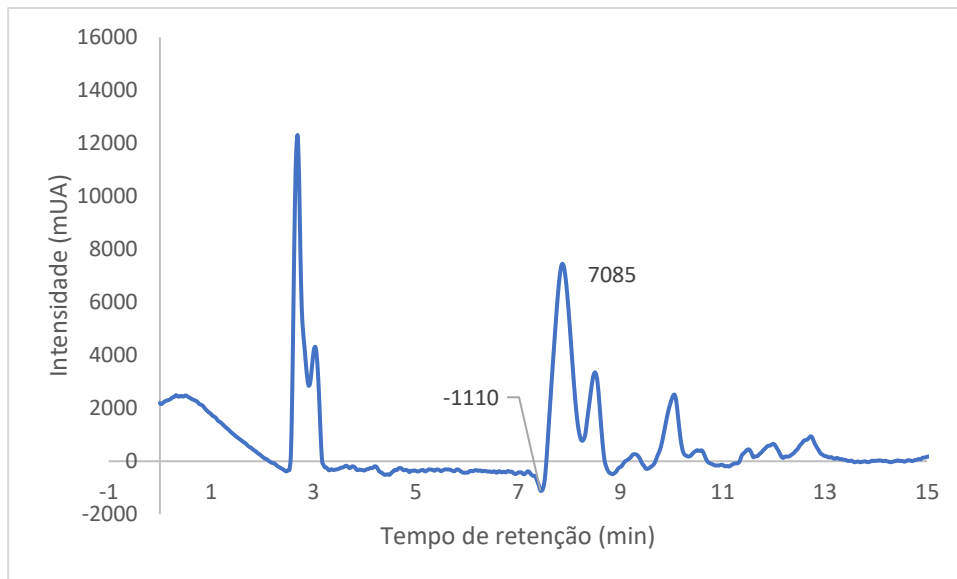


Figura 104 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação da Aramé, ao fim das 6 horas.



Figura 105 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação da Aramé, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol.



Figura 106 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação da Aramé, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol.

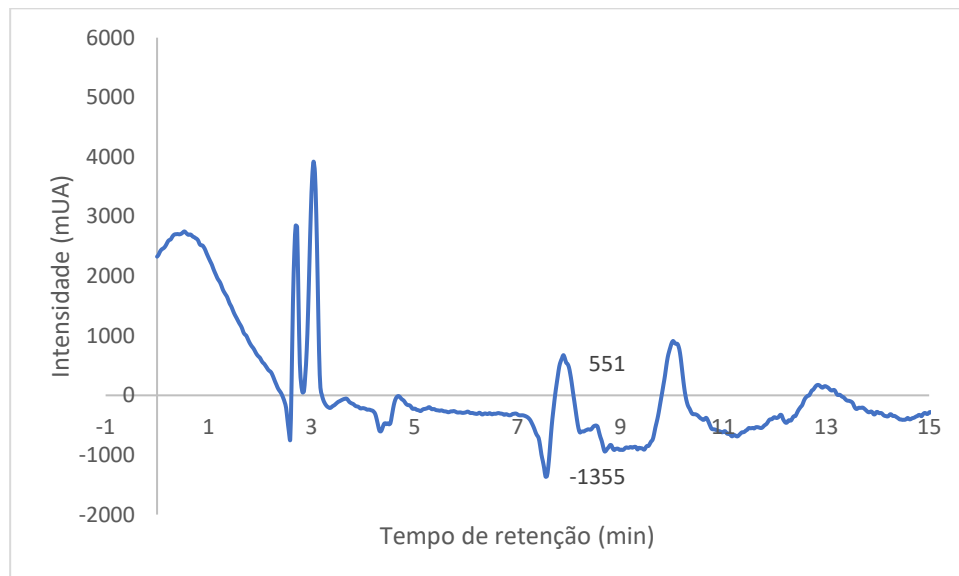


Figura 107 - Cromatograma 1 para a determinação da permeação da Aramé, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol e ezetimiba.

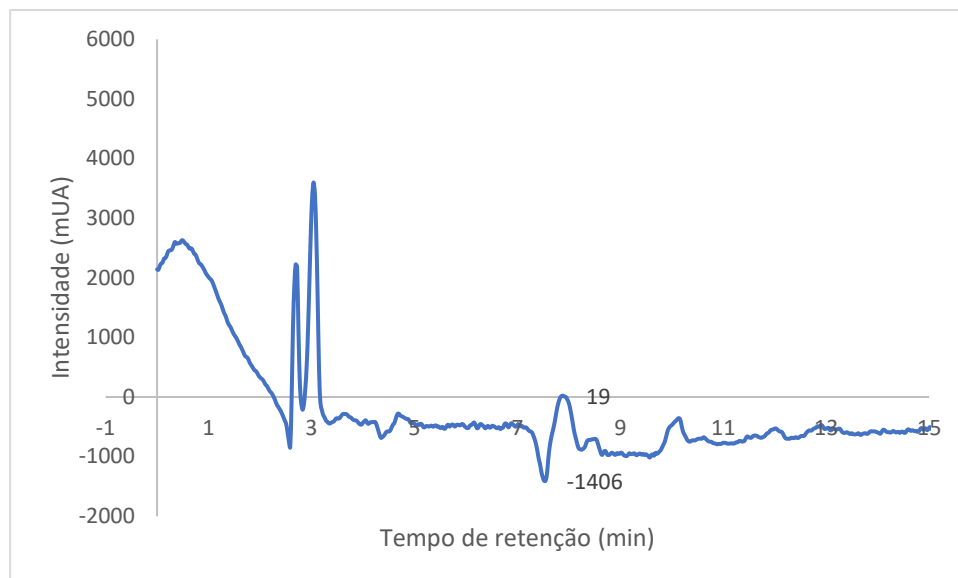


Figura 108 - Cromatograma 2 para a determinação da permeação da Aramé, ao fim das 6 horas, na presença de colesterol e ezetimiba.

Tabela 6 - Resultados obtidos para a permeação dos compostos bioativos das algas na barreira gastrointestinal.

Amostra	%Permeação	%Permeação média
N+Col	18,2131	21±5
	24,5812	
N+Col+E	17,0318	16,4±0,9
	15,7861	
F+Col	30,2170	30,7±0,7
	31,1513	
F+Col+E	18,9809	19,3±0,4
	19,5464	
A+Col	27,8229	10±2
	30,2118	
A+Col+E	25,1567	22±4
	18,8082	

3.3. Resultados obtidos da ação dos extratos de Aramé, Nori e Fucus nos metabolitos de Células Caco-2 e Hep-G2

3.3.1. Aramé

Tabela 7 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Aramé, no modo positivo, para células Caco-2.

Tempo de retenção (min)	m/z	[M]	Composto proposto	Fórmula Molecular	p-Value	Fold Change
17,66	654,3316	653,3243	1-[2-[[1-[2-[[2-[[2-[[2-(glicilamino)acetil]amino]acetil]amino]acetil]amino]acetil]proli]amino]-5-guanidino-pentanoil]prolina	C ₂₆ H ₄₃ N ₁₁ O ₉	1,0E-19	6,004
18,57	331,2842	330,2769	1-Monopalmitina	C ₁₉ H ₃₈ O ₄	1,0E-19	4,971

4,06	384,1149	383,1076	Succinil adenosina	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₈	1,0E-06	0,209
5,24	233,0950	232,0877	(2S) -1 - [(2S) -2- (mercaptometilamino) propanoil] prolina	C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	1,0E-06	0,073
13,83	256,3000	255,2927	(1,4-dimetil-4-propil-heptil)-(2-metilbutil)amina	C ₁₇ H ₃₇ N	1,0E-06	14,861
17,73	496,3396	495,3324	1-Palmitoilfosfatidilcolina	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	2,0E-06	3,899
1,79	162,0761	161,0688	3-amino-2,3-dideoxi-scilo-inosose	C ₆ H ₁₁ NO ₄	3,0E-06	0,021
2,09	269,0882	268,0809	Inosina	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	8,0E-06	0,148
3,66	219,0799	218,0726	Cys-Pro	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	8,0E-06	0,036
2,66	206,0846	205,0773	N-Propionilmetionina	C ₈ H ₁₅ NO ₃ S	1,1E-05	0,353
1,18	104,1070	103,0997	Colina	C ₅ H ₁₃ NO	2,0E-05	0,484
2,06	464,0811	463,0738	Adenilosuccinato	C ₁₄ H ₁₈ N ₅ O ₁₁ P	3,2E-05	7,942
6,51	288,0686	574,1224	Ácido carboxílico (2R,4S)-2-[(1R)-2-[[2-[(2-amino-2-carboxi- etil)disulfanil]-1-carboxi-etil]amino]-2-ceto-1-[(2-fenilacetil)amino]etil]-5,5- dimetil-tiazolidina-4	C ₃₄ H ₂₆ N ₂ OS ₃	3,3E-05	0,124
1,94	191,0484	190,0411	Ácido (2-ceto-2-tiazolidin-3-il-etil) carbâmico	C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₃ S	3,5E-05	0,060
8,10	456,1260	455,1183	Benzilpeniciloil-cisteína	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₆ S ₂	5,7E-05	12,607
15,65	480,3083	479,3010	1-(9Z-Octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	1,2E-04	2,612
18,92	226,1802	243,1834	Ácido Ciclohexanocarboxílico [2-hidroxi-3-(isopropilamino)propil] ester	C ₁₃ H ₂₅ NO ₃	1,5E-04	32,409
2,09	537,1688	536,1615	Ácido propiónico 3-[7-[4-(2-acetamido-4-metil-tiazol-5- il)sulfonilpiperazino]-5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-6-il]etil ester	C ₂₁ H ₂₈ N ₈ O ₅ S ₂	1,9E-04	0,015
15,24	454,2927	453,2855	fosfatidiletanolamina	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	2,5E-04	3,653
11,56	489,2274	488,2201	Ácido succínico O4-[4-[(E)-2-(3-hidroxi-5-metil-fenil)vinil]fenil] ester O1- (2-keto-3,5,5-trimethyl-4-vinyl-cyclohex-3-en-1-yl) ester	C ₃₀ H ₃₂ O ₆	3,4E-04	33,199
1,67	133,0595	264,1043	Tiamina	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ OS	5,1E-04	0,530
1,61	203,2230	202,2158	Espermina	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	8,3E-04	0,017
6,48	316,5792	631,1435	1-[5-(benziltio)-1,3,4-tiadiazol-2-il]-5-(3,4-dietoxifenil)-4-[2,3-dihidro-1,4- benzodioxin-6-il(hidroxi)metileno]pirrolidina-2,3-quinona	C ₃₂ H ₂₉ N ₃ O ₇ S ₂	8,9E-04	0,032
1,93	308,0907	307,0834	Glutaciona	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	8,9E-04	26,889
2,09	137,0458	136,0385	Hipoxantina	C ₅ H ₄ N ₄ O	9,7E-04	0,148
2,03	205,0643	204,0571	(1S,2R)-1-[3-(metiltio)-1H-pirazol-5-il]propano-1,2,3-triol	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	1,1E-03	0,023
2,18	132,1019	131,0946	L-Norleucina	C ₆ H ₁₃ NO ₂	n/a	0,352

Tabela 8 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Aramé, no modo positivo, para células Hep-G2.

Tempo de retenção (min)	m/z	[M]	Composto proposto	Fórmula Molecular	p-Value	Fold Change
4,62	298,0966	297,0893	5'-methylthioadenosine	C ₁₁ H ₁₅ N ₅ O ₃ S	0,00	2,856
13,85	256,2999	255,2926	(1,4-dimetil-4-propil-heptil)-(2-metilbutil)amina	C ₁₇ H ₃₇ N	0,00	3,237
18,98	408,3682	407,3609	2-amino-4- [2- (aminometil) octilamino] -N- [2- (4-metil-5-propil-1H-pirrol-3-il) etil] butiramida	C ₂₃ H ₄₅ N ₅ O	0,00	2,283
4,55	407,0955	384,1060	6-O-sinapoyl-D-glucono-1,5-lactona	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₀	5,0E-06	39,758
1,77	162,0760	161,0687	3-amino-2,3-dideoxi-scilo-inosose	C ₆ H ₁₁ NO ₄	5,9E-05	0,416
3,98	261,1308	238,1416	(2R)-3-[2-[(2R)-2,3-dihidroxi-2-metil- propoxi]ethoxi]-2-metil-propano-1,2-diol	C ₁₀ H ₂₂ O ₆	8,9E-05	20,095
1,60	203,2230	202,2157	Espermina	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	1,1E-04	0,443

4,20	395,2103	788,4059	L-fenilalanil-L-treonil-L-glutaminil-L-seril-L-leucil-L-prolil-L-prolina	C ₃₇ H ₅₆ N ₈ O ₁₁	2,0E-04	57,225
5,20	233,0950	232,0877	(2S) -1 - [(2S) -2- (mercaptometilamino) propanoil] prolina	C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	9,9E-04	0,593
1,92	308,0904	307,0831	Glutaciona	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	1,2E-03	4,104
4,97	114,0913	113,0842	ε-Caprolactama	C ₆ H ₁₁ NO	1,3E-03	0,446
1,65	133,0596	264,1045	Tiamina	C ₁₂ H ₁₆ N ₄ OS	1,4E-03	4,637
6,47	316,5789	631,1433	1-[5-(benziltio)-1,3,4-tiadiazol-2-il]-5-(3,4-dietoxifenil)-4-[2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il(hidroxi)metileno]pirrolidina-2,3-quinona	C ₃₂ H ₂₉ N ₃ O ₇ S ₂	2,2E-03	0,310
6,50	288,0684	574,1221	Ácido carboxílico (2R,4S)-2-[(1R)-2-[[2-[(2-amino-2-carboxi-etil)disulfanil]-1-carboxi-etil]amino]-2-ceto-1-[(2-fenilacetil)amino]etil]-5,5-dimetil-tiazolidina-4	C ₃₄ H ₂₆ N ₂ O ₅ S ₃	3,7E-03	0,276
3,61	219,0797	218,0724	Cys-Pro	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	6,7E-03	0,540
2,06	537,1685	536,1611	Ácido propiónico 3-[7-[4-(2-acetamido-4-metil-tiazol-5-il)sulfonilpiperazino]-5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-6-il] ethil ester	C ₂₁ H ₂₈ N ₈ O ₅ S ₂	2,8E-02	0,449

Tabela 9 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Aramé, no modo negativo, para células Caco-2.

Tempo de retenção (min)	m/z	[M]	Compostos propostos	Fórmula molecular	p-Value	Fold change
5,56	129,05546	130,06274	Cetoleucina	C ₆ H ₁₀ O ₃	0,00E+00	3,228
10,21	498,28933	499,29661	2-ceto-N-[6-(4-neopentilpiperazino)-3-piridil]-2-(2-fenil-5,6,7,8-tetra-hidroindolizin-3-il)acetamida	C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₂	0,00E+00	3,870
11,14	253,14445	254,15167	C75 trans	C ₁₄ H ₂₂ O ₄	0,00E+00	5,677
14,44	538,31475	539,32203	1-nonadecanoil-glicero-3-fosfoserina	C ₂₅ H ₅₀ NO ₉ P	0,00E+00	5,626
15,75	441,25261	442,25989	2-[3-[3-[3-(3-Octoxipropoxi)propoxi]propoxi]etil]hidrogenossulfato	C ₂₀ H ₄₂ O ₈ S	0,00E+00	6,707
16,21	438,29888	439,30615	1-hexadecil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	C ₂₁ H ₄₆ NO ₆ P	0,00E+00	5,295
16,93	271,22778	272,23506	Ácido 16-hidroxi-hexadecanóico	C ₁₆ H ₃₂ O ₃	0,00E+00	3,248
14,94	555,27249	556,27977	PG(22:6(4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)/0:0)	C ₂₈ H ₄₅ O ₉ P	1,00E-06	25,118
1,95	362,05083	363,0581	Monofosfato de guanosina	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	5,00E-06	1,907
15,62	478,29378	479,30105	PE(18:1(9Z)/0:0)	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	1,00E-05	9,433
5,72	615,34722	616,3545	H-Ala-Ala-Thr-Lys-Ala-Thr-Ala-al	C ₂₆ H ₄₈ N ₆ O ₉	1,10E-05	0,320
1,95	243,06219	244,06945	Uridina	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	1,80E-05	0,200
10,98	286,12949	287,1368	2E-Hexenedioilcarnitina	C ₁₃ H ₂₁ NO ₆	2,20E-05	5,340
14,51	311,16859	312,17586	Ácido 5-hidroxeicosatetraenoico	C ₂₀ H ₂₄ D ₈ O ₃	3,20E-05	7,479
1,6	185,02186	186,02914	2-[1-(Metildissulfanil)etil]pirazina	C ₇ H ₁₀ N ₂ S ₂	4,00E-05	0,035
15,58	433,1405	434,14778	1-(3-Etilsulfonilciclohexil)-2-metil-3-[2-[(5-metil-2-tienil)sulfonilamino]etil]guanidina	C ₁₇ H ₃₀ N ₄ O ₃ S ₃	4,20E-05	2,173
1,73	426,02213	427,02941	ADP	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	4,60E-05	2,942
15,54	397,22642	398,2337	1-[1-(2-Dodecoxietoxi)etoxi]etil hidrogenossulfato	C ₁₈ H ₃₈ O ₇ S	4,80E-05	7,267
8,19	138,01986	139,02713	4-Nitrofenol	C ₆ H ₅ NO ₃	6,90E-05	3,730
15,23	452,27806	453,28534	lisofosfatidiletanolamina	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	1,43E-04	7,699
14,17	500,27807	501,28535	2-araquidonil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	C ₂₅ H ₄₄ NO ₇ P	1,67E-04	14,480

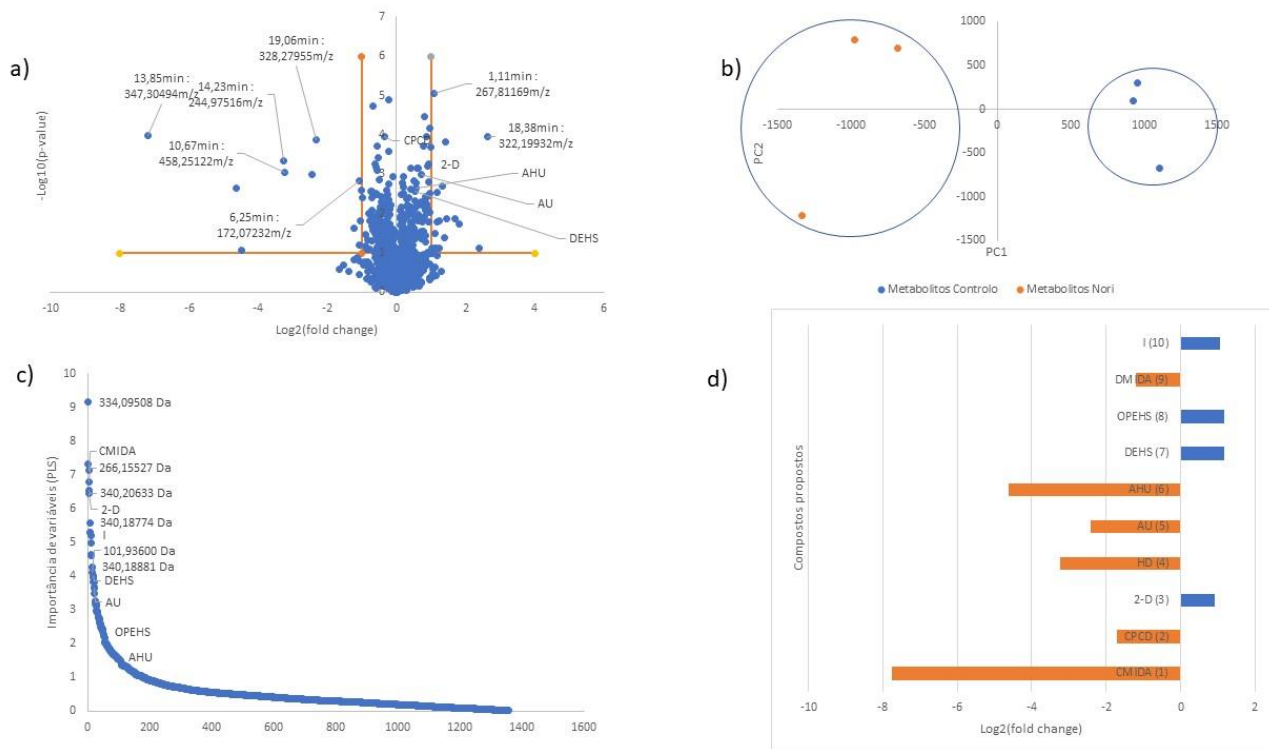
1,95	289,06747	290,07474	ácido succínico 2-[[2-acetamido-3-carboxi-propanoil]amino]	C ₁₀ H ₁₄ N ₂ O ₈	1,91E-04	0,189
11,08	243,16016	244,16744	Ácido 1,11-Undecanodicarboxílico	C ₁₃ H ₂₄ O ₄	2,67E-04	2,976
9,43	215,12878	216,13605	Ácido Undecanodioico	C ₁₁ H ₂₀ O ₄	3,24E-04	2,427
2,28	251,07857	252,08584	Desoxinosina	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₄	5,02E-04	0,187
17,41	540,33023	541,33751	1-(2-Metoxi-octadecanil)-sn-glicero-3-fosfoserina	C ₂₅ H ₅₂ NO ₉ P	5,33E-04	21,970
5,4	651,31056	652,31783	H-Gly-Ser-Ala-Lys-Tyr-Gln-OH	C ₂₈ H ₄₄ N ₈ O ₁₀	1,01E-03	0,369
2,05	161,04556	162,05284	Ácido 3-hidroxi-3-metil-glutárico	C ₆ H ₁₀ O ₅	8,30E-03	2,193
1,93	611,14447	612,15175	Glutationa, oxidada	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	9,90E-03	3,386
2,04	282,0844	283,09171	Guanosina	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	1,15E-02	1,915

Tabela 10 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Aramé, no modo negativo, para células Hep-G2.

Tempo de retenção (min)	m/z	[M]	Composto proposto	Fórmula Molecular	p-Value	Fold change
12,93	215,16539	216,17266	2-Hidroxidodecanoico	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	0,0	7,323
15,95	522,28375	523,29103	fosforilserina	C ₂₄ H ₄₆ NO ₉ P	0,0	6,590
15,44	496,26830	497,27558	PS(16:0/0:0)	C ₂₂ H ₄₄ NO ₉ P	1,00E-06	7,357
4,54	382,55036	767,11528	Coenzima A	C ₂₁ H ₃₆ N ₇ O ₁₆ P ₃ S	4,00E-06	3,439
14,65	311,16867	312,17594	Ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico	C ₂₀ H ₂₄ D ₈ O ₃	4,00E-06	3,911
15,82	325,18424	326,19152	Ácido 2-Dodecilbenzenesulfonico	C ₁₈ H ₃₀ O ₃ S	5,00E-06	3,475
10,98	286,12977	287,13705	2E-Hexenedioilcarnitina	C ₁₃ H ₂₁ NO ₆	1,10E-05	2,877
11,15	253,14465	254,15193	C75 trans	C ₁₄ H ₂₂ O ₄	2,10E-05	2,323
1,94	243,06229	244,06955	Uridina	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	2,30E-05	0,280
4,39	144,06634	145,07361	Alisina	C ₆ H ₁₁ NO ₃	4,60E-05	5,419
1,94	135,03098	136,03826	Hipoxantina	C ₅ H ₄ N ₄ O	2,60E-04	0,233
15,63	478,29398	479,30126	1-(9Z-Octadecenoil)-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	8,90E-04	1,858
13,93	357,14976	358,15704	Ácido 16-Feruloiloxipalmitico	C ₂₆ H ₄₀ O ₆	3,27E-03	0,357
13,07	298,07211	299,07939	8-Amino-2-(3,4-dihroxifenil)-3-hidroxi-6-metil-cromona	C ₁₆ H ₁₃ NO ₅	4,03E-03	0,439
13,55	357,14947	358,15675	ácido acético 2-[4-[(E)-1-(4-hidroxifenil)-2-fenil-but-1-enilfenil]	C ₂₄ H ₂₂ O ₃	8,96E-03	0,369
15,59	433,14071	434,14799	1-(3-Etilsulfonilciclohexil)-2-metil-3-[2-[(5-metil-2-thienil)sulfonilamino]ethyl]guanidina	C ₁₇ H ₃₀ N ₄ O ₃ S ₃	1,75E-02	0,401
8,18	138,01974	139,02701	4-Nitrofenol	C ₆ H ₅ NO ₃	2,09E-02	0,452

3.3.2. Nori

1)



2)

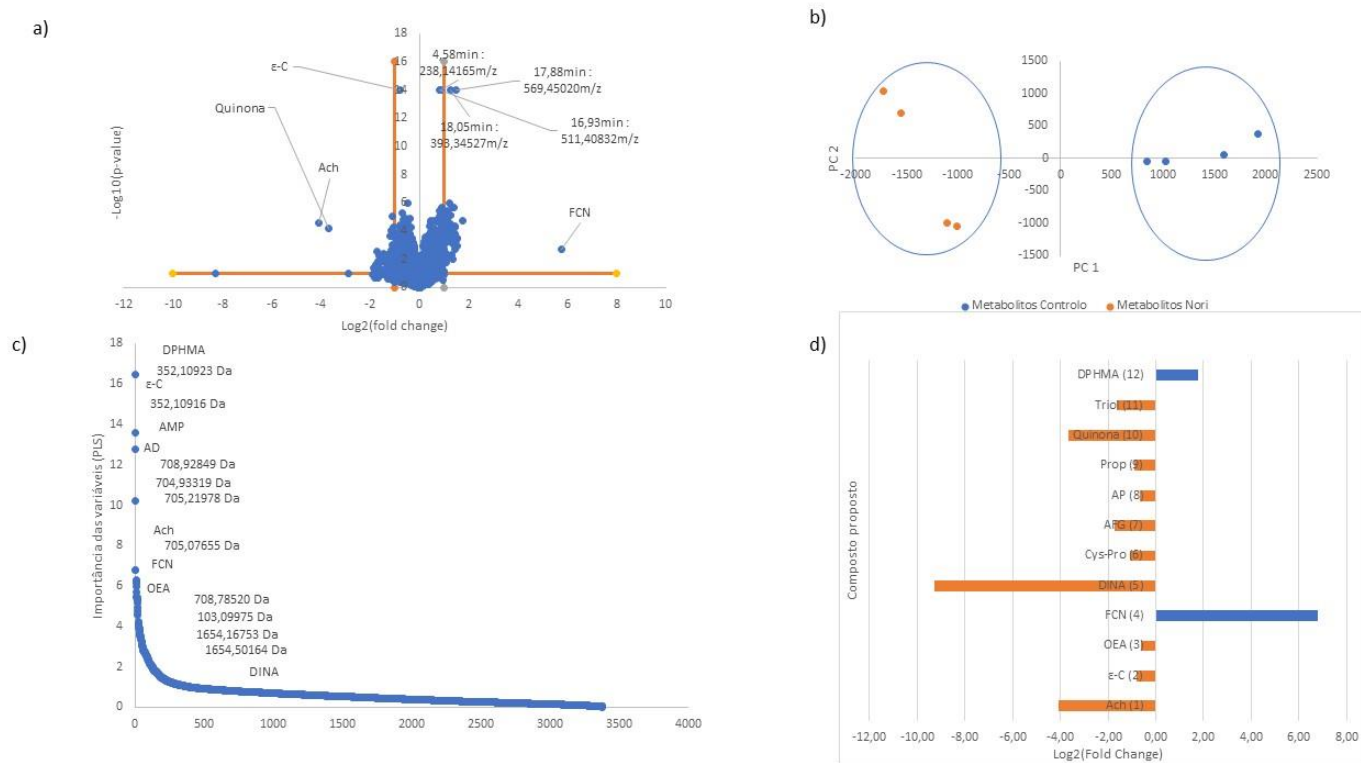
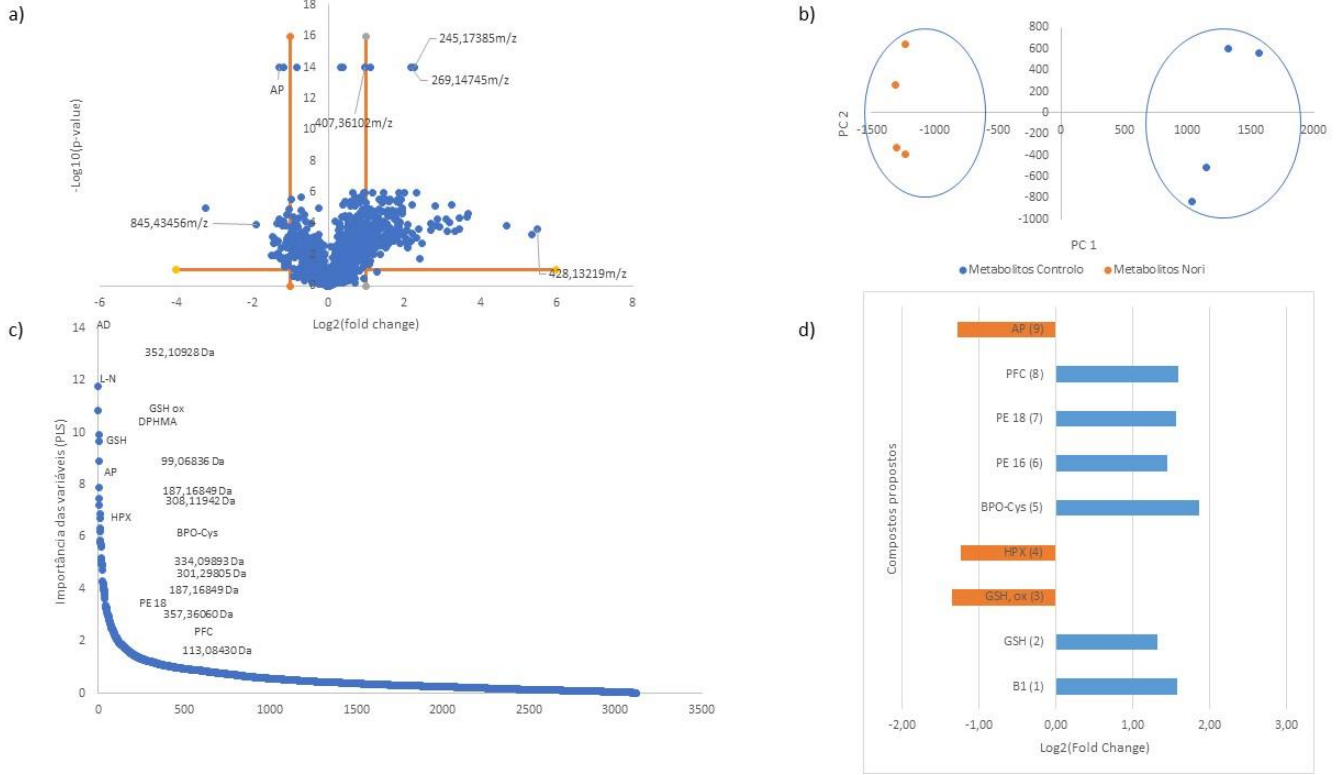


Figura 109 - Análise dos compostos que variam na presença ou ausência de Nori, para as células Caco-2, modo positivo (1) e modo negativo (2). a) gráfico do volcano; b) gráfico PCA; c) gráfico PLS; d) gráfico $\log_2(\text{fold change})$.

1)



2)

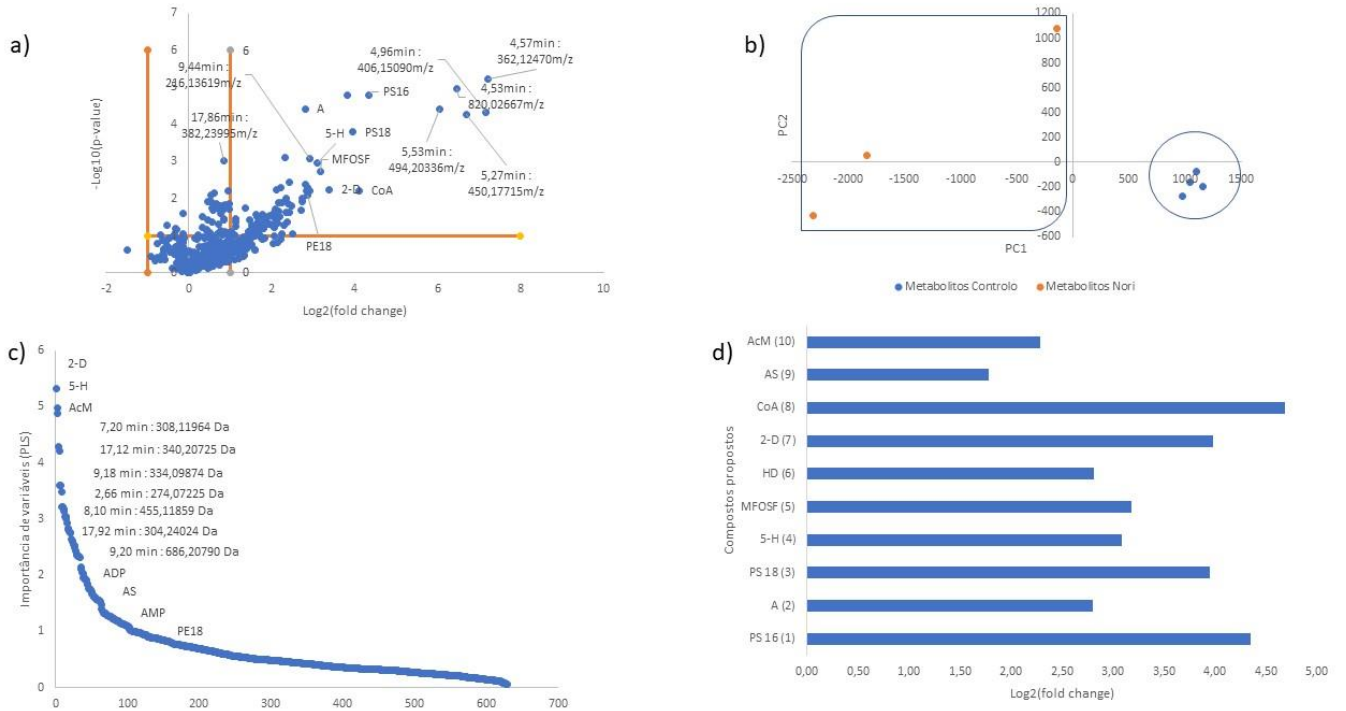


Figura 110 - Análise dos compostos que variam na presença ou ausência de Nori, para as células Hep-G2, modo positivo (1) e modo negativo (2). a) gráfico do volcano; b) gráfico PCA; c) gráfico PLS; d) gráfico log2(fold change).

Tabela 11 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Nori, no modo positivo, para células Caco-2.

Tempo de retenção (min)	m/z	[M]	Composto proposto	Fórmula Molecular	p-Value	Fold Change
5,00	114,091	113,085	ε-Caprolactama	C ₆ H ₁₁ NO	0,0	0,577
3,65	219,080	218,073	Cys-Pro	C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₃ S	9,0E-06	0,472
13,83	256,300	255,293	(1,4-dimetil-4-propil-heptil)-(2-metilbutil)amina	C ₁₇ H ₃₇ N	1,9E-05	3,362
1,18	146,118	145,110	Acetilcolina	C ₇ H ₁₅ NO ₂	2,5E-05	0,059
3,06	261,091	260,083	6-(etiltio)-1-(2-hidroxi-etoximetil)-5-metil-pirimidina-2,4-quinona	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₄ S	7,0E-05	0,079
1,99	136,075	135,068	Fenacilamina	C ₈ H ₉ NO	2,1E-03	110,083
17,43	370,332	369,325	Aplidiasfingosina	C ₂₂ H ₄₃ NO ₃	2,9E-03	0,302
2,05	205,064	204,057	(1S,2R)-1-[3-(metiltio)-1H-pirazol-5-yl]propano-1,2,3-triol	C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₃ S	2,1E-02	0,319
14,86	239,664	477,314	Dibenzil-[4-(3,7-ditert-butil-4H-diazepin-5-il)fenil]amina	C ₃₃ H ₃₉ N ₃	1,1E-01	0,002
2,10	537,169	536,162	Ácido propiónico 3-[7-[4-(2-acetamido-4-metil-tiazol-5-il)sulfonilpiperazino]-5-metil-[1,2,4]triazolo[1,5-a]pirimidin-6-il]etil ester	C ₂₁ H ₂₈ N ₈ O ₅ S ₂	1,2E-01	0,530
18,37	256,264	255,256	Amida Palmítica	C ₁₆ H ₃₃ NO	5,0E-06	0,627
18,46	282,279	281,272	Oleamida	C ₁₈ H ₃₅ NO	1,6E-05	0,647

Tabela 12 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Nori, no modo positivo, para células Hep-G2.

Tempo de retenção (min)	m/z	[M]	Composto proposto	Fórmula Molecular	p-Value	Fold Change
18,36	256,2636	255,2564	Amida Palmítica	C ₁₆ H ₃₃ NO	0,0	0,413
15,24	454,2929	453,2857	fosfatidiletanolamina	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	1,0E-06	2,721
8,10	456,1258	455,1185	Benzilpeniciloil-cisteína	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₆ S ₂	3,0E-06	3,662
15,64	480,3083	479,3010	PE(18:1(9Z)/0:0)	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	3,4E-05	2,973
1,94	307,0831	612,1516	Glutaciona, oxidada	C ₂₀ H ₃₂ N ₆ O ₁₂ S ₂	9,4E-05	0,394
17,51	496,3396	495,3323	1-Palmitoilfosfatidilcolina	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	4,0E-04	3,028

1,91	308,0905	307,0832	Glutaciona	C10H17N3O6S	1,1E-03	2,505
1,65	133,0597	264,1046	Tiamina	C12H16N4OS	2,4E-03	2,981
1,94	137,0458	136,0385	Hipoxantina	C5H4N4O	9,7E-02	0,426

Tabela 13 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Nori, no modo negativo, para células Caco-2.

Tempo de retenção (min)	m/z	[M]	Compostos propostos	Fórmula molecular	p-Value	Fold change
10,20	498,28823	499,29550	2-ceto-N-[6-(4-neopentilpiperazino)-3-piridil]-2-(2-fenil-5,6,7,8-tetra-hidroindolizin-3-il)acetamida	C ₃₀ H ₃₇ N ₅ O ₂	1,04E-04	0,005
7,97	302,14213	303,14941	(1S)-N-(4-Etilciclohexil)-2-[(metiltio)oxiperoximetil]ciclopropanocarboxamida	C ₁₄ H ₂₅ NO ₄ S	1,35E-04	0,303
15,61	325,18347	326,19075	Ácido 2-Dodecilbenzenesulfônico	C ₁₈ H ₃₀ O ₃ S	6,14E-04	1,873
13,61	215,16408	216,17135	Ácido 2-Hidroxidodecanoico	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	9,11E-04	0,106
9,43	215,12912	216,13640	Ácido Undecanodioico	C ₁₁ H ₂₀ O ₄	1,02E-03	0,186
17,32	199,13390	200,14117	Ácido 2-hidroxi-10-undecanóico	C ₁₁ H ₂₀ O ₃	2,21E-03	0,040
15,53	397,22575	398,23303	1-[1-(2-Dodecoxietoxi)etoxi]etil hidrogenossulfato	C ₁₈ H ₃₈ O ₇ S	2,83E-03	2,241
15,89	485,27877	486,28605	2-[3-[3-[3-(3-Octoxipropoxi)propoxi]propoxi]propoxi]etil hidrogenossulfato	C ₂₂ H ₄₆ O ₉ S	1,60E-02	2,238
19,33	511,44492	512,45219	2-[2-[2-(Di-hexilamino)-2-ceto-etoxi]etoxi]-N,N-di-hexil-acetamida	C ₃₀ H ₆₀ N ₂ O ₄	2,29E-02	0,432
2,08	267,07555	268,08214	Inosina	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	3,38E-02	2,094

Tabela 14 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Nori, no modo negativo, para células Hep-G2.

Tempo de retenção (min)	m/z	[M]	Composto proposto	Fórmula Molecular	p-Value	Fold change
15,45	496,26830	497,27558	PS(16:0/0:0)	C ₂₂ H ₄₄ NO ₉ P	1,60E-05	20,351
4,40	144,06634	145,07361	Alisina	C ₆ H ₁₁ NO ₃	3,90E-05	6,996
15,95	522,28375	523,29103	PS(18:1(9Z)/0:0)	C ₂₄ H ₄₆ NO ₉ P	1,61E-04	15,460
14,67	311,16877	312,17605	Ácido 5-hidroxieicosatetraenoico	C ₂₀ H ₂₄ D ₈ O ₃	1,10E-03	8,524
17,35	540,33083	541,33811	1-(2-Metoxi-octadecanil)-sn-glicero-3-fosfoserina	C ₂₅ H ₅₂ NO ₉ P	1,91E-03	9,071
12,94	215,16534	216,17262	2-Hidroxidodecanoico	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	4,07E-03	7,027
15,79	325,18435	326,19162	Ácido 2-Dodecilbenzenesulfônico	C ₁₈ H ₃₀ O ₃ S	5,85E-03	15,791
4,54	382,55025	767,11505	Coenzima A	C ₂₁ H ₃₆ N ₇ O ₁₆ P ₃ S	6,01E-03	25,771
2,00	117,01907	118,02649	Ácido Sucínico	C ₄ H ₆ O ₄	2,99E-02	3,448
1,32	89,02450	90,03178	Ácido Metoxiacético	C ₃ H ₆ O ₃	5,10E-02	4,879

3.3.3. Fucus

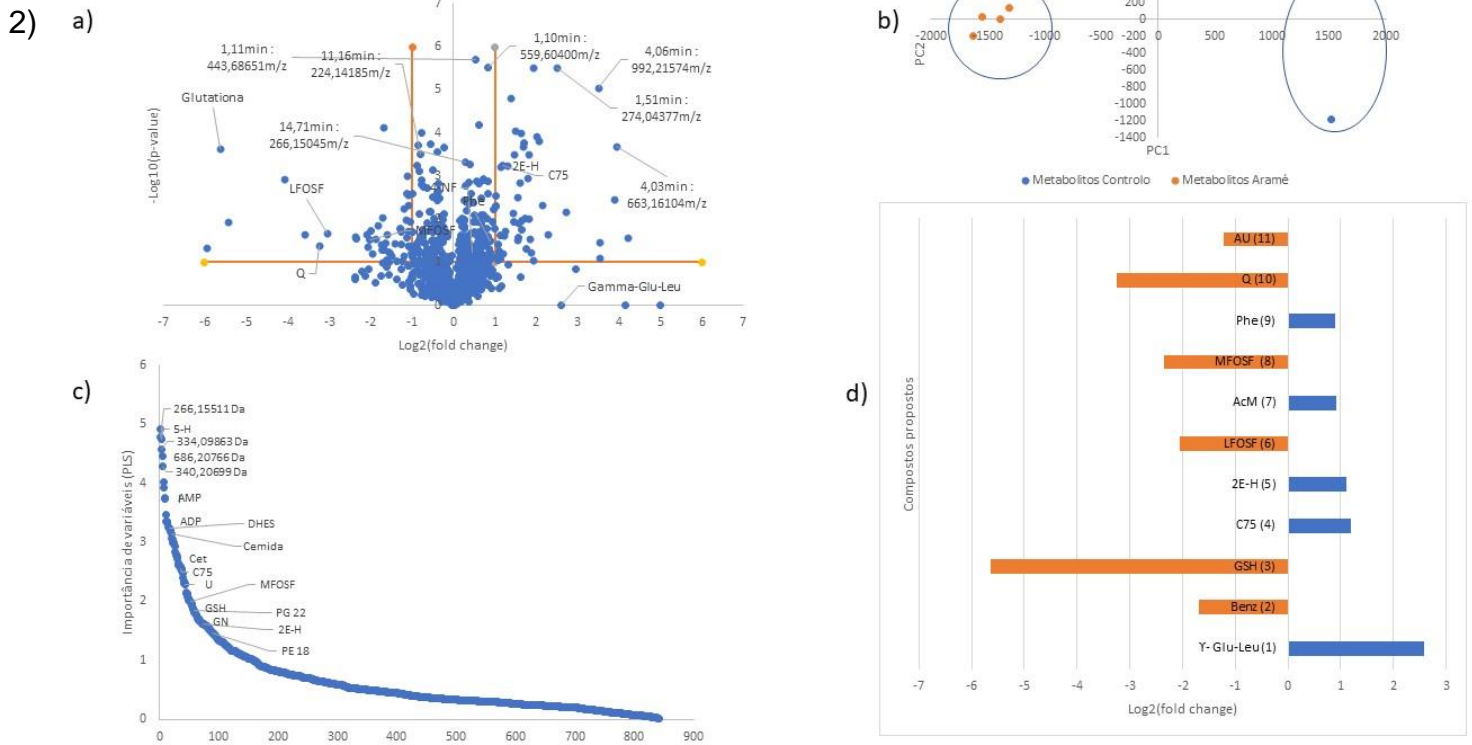
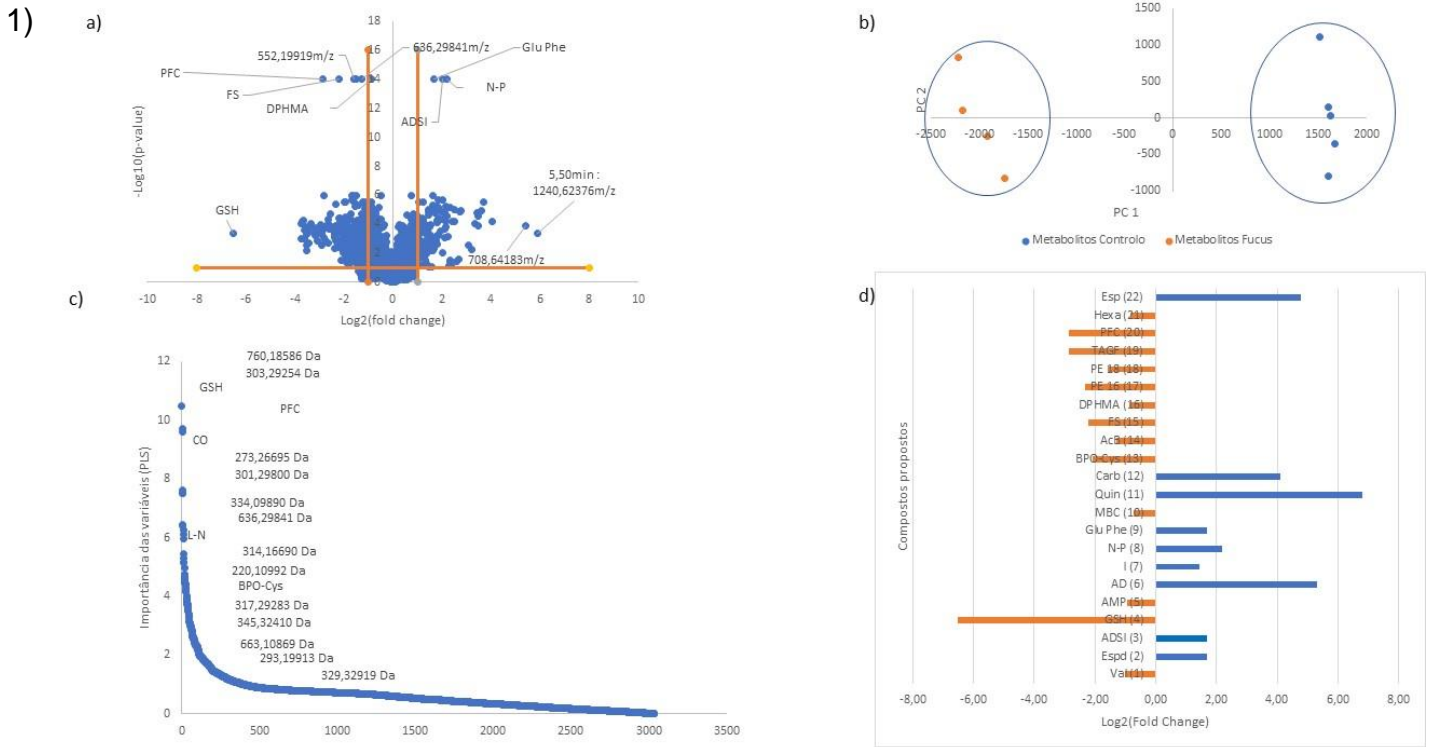


Figura 111 - Análise dos compostos que variam na presença ou ausência de Fucus, para as células Caco-2, modo positivo (1) e modo negativo (2). a) gráfico do volcano; b) gráfico PCA; c) gráfico PLS; d) gráfico log2(fold change).

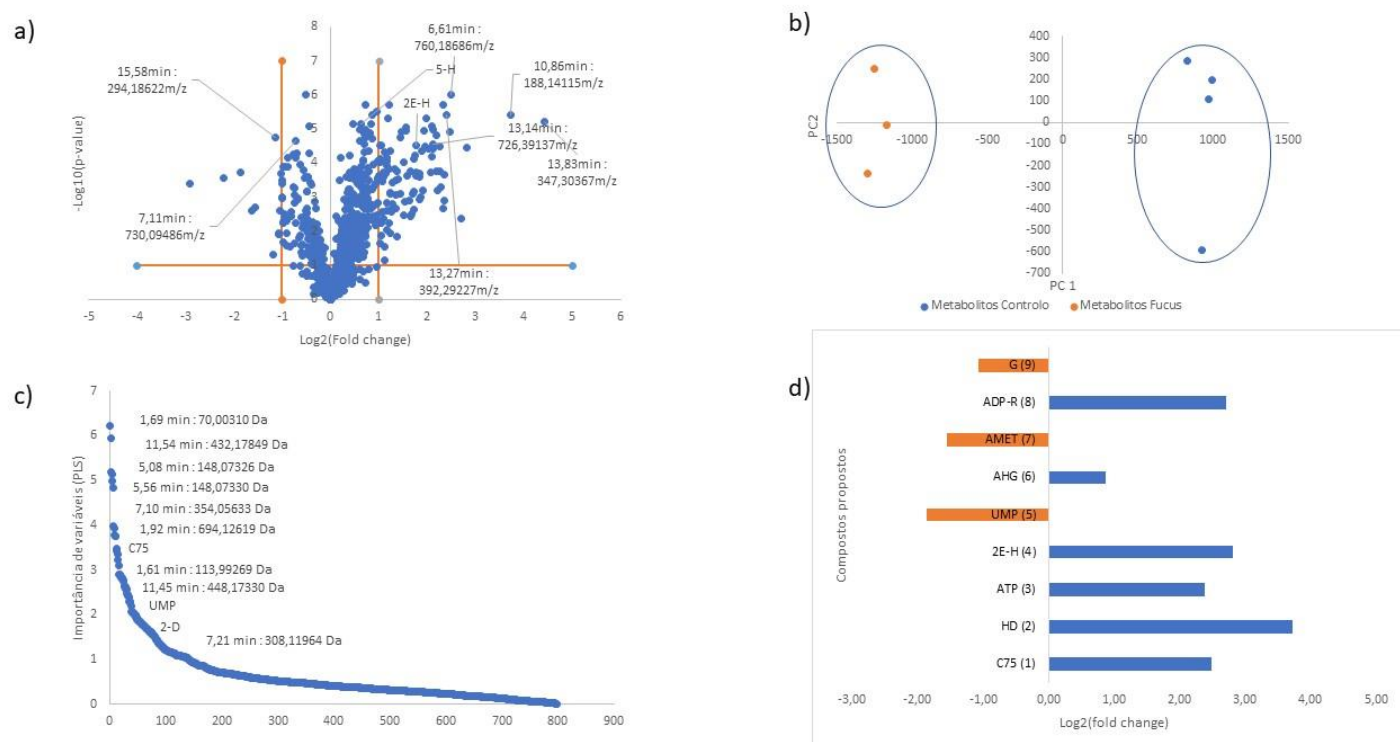
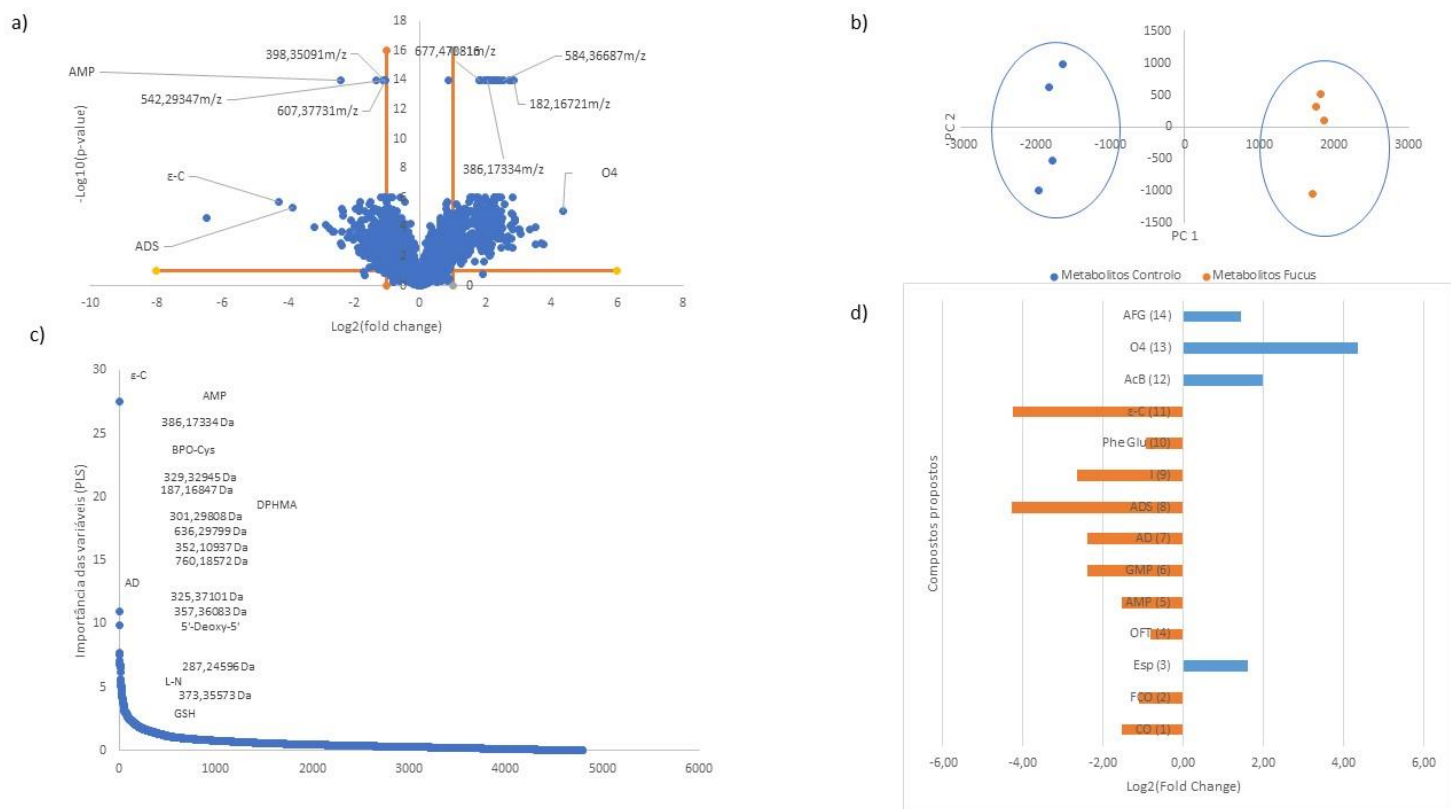


Figura 112 - Análise dos compostos que variam na presença ou ausência de Fucus, para as células Hep-G2, modo positivo (1) e modo negativo (2). a) gráfico do volcano; b) gráfico PCA; c) gráfico PLS; d) gráfico log2(fold change).

Tabela 15 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Fucus, no modo positivo, para células Caco-2.

Tempo de retenção (min)	m/z	[M]	Composto proposto	Fórmula Molecular	p-Value	Fold Change
1,78	162,0761	161,0688	3-amino-2,3-dideoxi-scilo-inosose	C ₆ H ₁₁ NO ₄	0,0	3,245
2,63	206,0845	205,0772	N-Propionilmetionina	C ₈ H ₁₅ NO ₃ S	0,0	4,607
5,28	295,1286	294,1213	Glu Phe	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	0,0	3,197
13,47	300,2896	299,2823	Esfingosina	C ₁₈ H ₃₇ NO ₂	0,0	0,218
13,85	256,2999	255,2926	(1,4-dimetil-4-propil-heptil)-(2-metilbutil)amina	C ₁₇ H ₃₇ N	0,0	0,550
15,57	480,3084	479,3011	PE(18:1(9Z)/0:0)	C ₂₃ H ₄₆ NO ₇ P	0,0	0,332
17,06	496,3397	495,3325	1-Palmitoilfosfatidilcolina	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	0,0	0,137
16,22	496,3397	495,3325	1-Tetradecil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfocolina	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	1,0E-06	0,144
6,49	288,0682	574,1218	Ácido carboxílico (2R,4S)-2-[[[(1R)-2-[[[2-(2-amino-2-carboxi-etil)disulfanil]-1-carboxi-etil]amino]-2-ceto-1-[(2-fenilacetil)amino]etil]-5,5-dimetil-tiazolidina-4	C ₃₄ H ₂₆ N ₂ OS ₃	3,0E-06	17,130
15,18	454,2927	453,2854	PE(16:0/0:0)	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	4,0E-06	0,201
2,01	269,0881	268,0808	Inosina	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	2,2E-05	2,740
5,51	246,1700	245,1627	2-Metilbutirolcarnitina	C ₁₂ H ₂₃ NO ₄	3,6E-05	0,608
1,94	348,0701	347,0628	Monofosfato de adenosina	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	5,4E-05	0,524
1,92	308,0906	307,0834	Glutaciona	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	4,5E-04	0,011
8,10	456,1255	455,1182	Benzilpeniciloil-cisteína	C ₁₉ H ₂₅ N ₃ O ₆ S ₂	4,9E-04	0,239
10,21	924,4959	923,4887	Ácido (2S)-2-[[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-1-[(2S)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-amino-3-(4-hidroxifenil)propanoil]amino]-4-metil-pentanoil]amino]propanoil]proil]proil]amino]propanoil]amino]-3-(1H-imidazol-5-il)propanoil]amino]acetil]amino]-3-metil-butiric	C ₄₄ H ₆₅ N ₁₁ O ₁₁	9,0E-04	0,406
17,93	255,2319	254,2247	11Z-Ácido Hexadecenóico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	1,3E-03	0,557
1,33	146,1652	145,1579	Espermidina	C ₇ H ₁₉ N ₃	6,8E-03	3,257
1,26	118,0862	117,0790	L-Valina	C ₅ H ₁₁ NO ₂	3,5E-02	0,502
1,63	203,2231	202,2158	Espermina	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	n/a	27,533
1,98	268,1039	267,0966	Adenosina	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	n/a	39,521
6,47	316,5789	631,1433	1-[5-(benziltio)-1,3,4-tiadiazol-2-il]-5-(3,4-dietoxifenil)-4-[2,3-dihidro-1,4-benzodioxin-6-il(hidroxi)metileno]pirrolidina-2,3-quinona	C ₃₂ H ₂₉ N ₃ O ₇ S ₂	n/a	110,925

Tabela 16 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Fucus, no modo positivo, para células Hep-G2.

Tempo de retenção (min)	m/z	[M]	Composto proposto	Fórmula Molecular	p-Value	Fold Change
1,93	364,0654	363,0581	Monofosfato de guanosina	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₈ P	0,0	0,189

10,26	924,4943	923,4870	Ácido (2S)-2-[[2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-1-[(2S)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-2-[[[(2S)-2-amino-3-(4-hidroxifenil)propanoil]amino]-4-metil-pentanoil]amino]propanoil]proil]proil]amino]propanoil]amino]-3-(1H-imidazol-5-il)propanoil]amino]acetil]amino]-3-metil-butíric	C ₄₄ H ₆₅ N ₁₁ O ₁₁	0,0	3,973
4,98	114,0913	113,0841	ε-Caprolactama	C ₆ H ₁₁ NO	2,0E-06	0,052
2,04	464,0810	463,0737	Adenilosuccinato	C ₁₄ H ₁₈ N ₅ O ₁₁ P	5,0E-06	0,052
3,66	295,1289	294,1216	Phe Glu	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₅	5,0E-06	0,523
11,55	489,2272	488,2199	Ácido succínico O4-[4-(E)-2-(3-hidroxi-5-metil-fenil)vinil]fenil] ester O1-(2-keto-3,5,5-trimethyl-4-vinyl-cyclohex-3-en-1-yl) ester	C ₃₀ H ₃₂ O ₆	8,0E-06	20,457
17,43	370,3324	369,3247	Aplidiasfingosina	C ₂₂ H ₄₃ NO ₃	8,2E-05	2,718
2,05	137,0458	136,0385	5-amino-1-formilimidazole-4-carbonitrilo	C ₅ H ₄ N ₄ O	1,1E-04	0,110
2,05	269,0880	268,0805	Inosina	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	2,1E-04	0,160
1,15	104,1070	103,0998	Colina	C ₅ H ₁₃ NO	3,7E-04	0,347
1,93	348,0703	347,0631	Monofosfato de adenosina	C ₁₀ H ₁₄ N ₅ O ₇ P	6,0E-04	0,346
1,53	184,0732	183,0659	Fosfocolina	C ₅ H ₁₄ NO ₄ P	7,3E-04	0,461
1,61	203,2232	202,2159	Espermina	C ₁₀ H ₂₆ N ₄	1,1E-03	3,034
1,98	268,1040	267,0967	Adenosina	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₄	1,4E-03	0,192
1,92	290,1346	289,1274	ácido oftálmico	C ₁₁ H ₁₉ N ₃ O ₆	1,5E-01	0,563

Tabela 17 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Fucus, no modo negativo, para células Caco-2.

Tempo de retenção (min)	m/z	[M]	Compostos propostos	Fórmula molecular	p-Value	Fold change
4,92	259,13191	260,13918	Gamma-Glu-Leu	C ₁₁ H ₂₀ N ₂ O ₅	0,00E+00	6,005
1,6	302,53124	607,07703	4-[bis(2-Cianoetil)sulfamoil]-N-(6-metil-1,3-benzotiazol-2-yl)-N-[(E)-(5-nitro-2-tienil)metileneamino]benzamida	C ₂₆ H ₂₁ N ₇ O ₅ S ₃	7,40E-05	0,311
1,94	306,07486	307,08214	Glutaciona	C ₁₀ H ₁₇ N ₃ O ₆ S	2,29E-04	0,020
11,16	253,14529	254,15256	C75 trans	C ₁₄ H ₂₂ O ₄	5,77E-04	2,274
10,99	286,1302	287,13748	2E-Hexenedioilcarnitina	C ₁₃ H ₂₁ NO ₆	5,96E-04	2,172
15,2	452,27694	453,28421	lisofosfatidiletanolamina	C ₂₁ H ₄₄ NO ₇ P	2,16E-02	0,239
1,29	89,02467	90,03194	Ácido Metoxiacético	C ₃ H ₆ O ₃	2,41E-02	1,885
16,2	540,33186	541,33913	1-(2-Metoxi-octadecanil)-sn-glicero-3-fosfoserina	C ₂₅ H ₅₂ NO ₉ P	3,13E-02	0,196
3,34	164,07152	165,07879	L-Fenilalanina	C ₉ H ₁₁ NO ₂	3,17E-02	1,863
18,48	239,04577	240,05305	2-Acetil-1H-benzof[<i>f</i>]benzimidazole-4,9-quinona	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₃	4,08E-02	0,106
9,44	215,12882	216,13609	Ácido Undecanodioico	C ₁₁ H ₂₀ O ₄	4,53E-02	0,432

Tabela 18 - Compostos propostos que mais variam na presença ou ausência de Fucus, no modo negativo, para células Hep-G2.

Tempo de retenção (min)	m/z	[M]	Composto proposto	Fórmula Molecular	p-Value	Fold change
11,14	253,14453	254,15176	C75 trans	C ₁₄ H ₂₂ O ₄	1,00E-06	5,605
13,60	215,16524	216,17252	2-Hidroxidodecanoico	C ₁₂ H ₂₄ O ₃	4,00E-06	13,275
1,90	505,98832	506,99560	Trifosfato de adenosina	C ₁₀ H ₁₆ N ₅ O ₁₃ P ₃	4,00E-06	5,236
10,98	286,12960	287,13695	2E-Hexenedioilcarnitina	C ₁₃ H ₂₁ NO ₆	3,60E-05	7,024
1,72	323,02864	324,03592	Monofosfato de Uridina	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₉ P	1,87E-04	0,275
2,06	161,04541	162,05269	Ácido 3-Hidroxi-3-metil-Glutárico	C ₆ H ₁₀ O ₅	5,98E-04	1,821
4,89	190,05421	191,06149	N-Acetil-DL-metionina	C ₇ H ₁₃ NO ₃ S	2,00E-03	0,342
1,92	540,05377	541,06104	ADP-ribose ciclico	C ₁₅ H ₂₁ N ₅ O ₁₃ P ₂	4,33E-03	6,512
15,56	433,14084	434,14812	1-(3-Etilsulfinilciclohexil)-2-metil-3-[2-[(5-metil-2-thienil)sulfonilamino]ethyl]guanidina	C ₁₇ H ₃₀ N ₄ O ₃ S ₃	1,18E-02	0,479

3.4. Reta de Calibração e Resultados obtidos no Método de Bradford

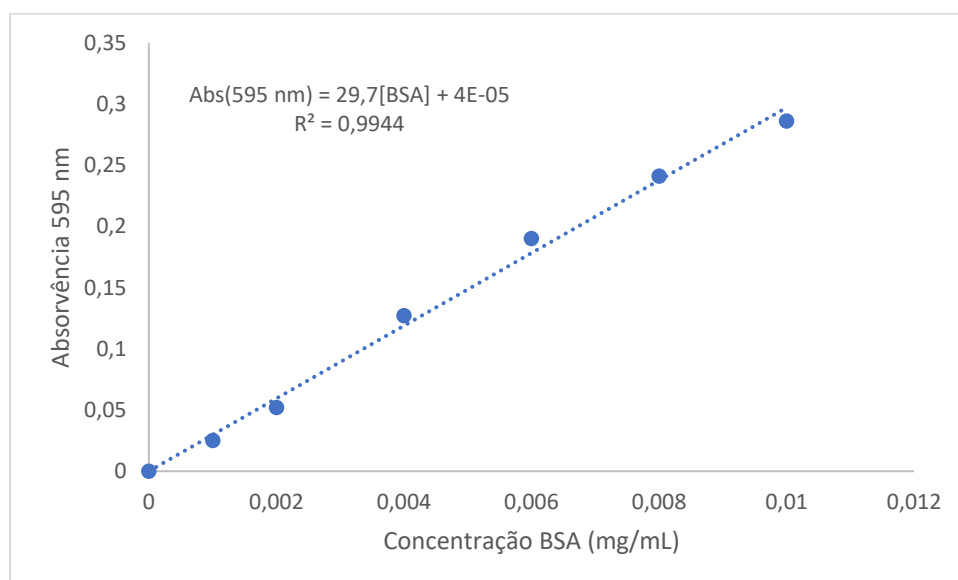


Figura 113 - Reta de Calibração do Método de Bradford.

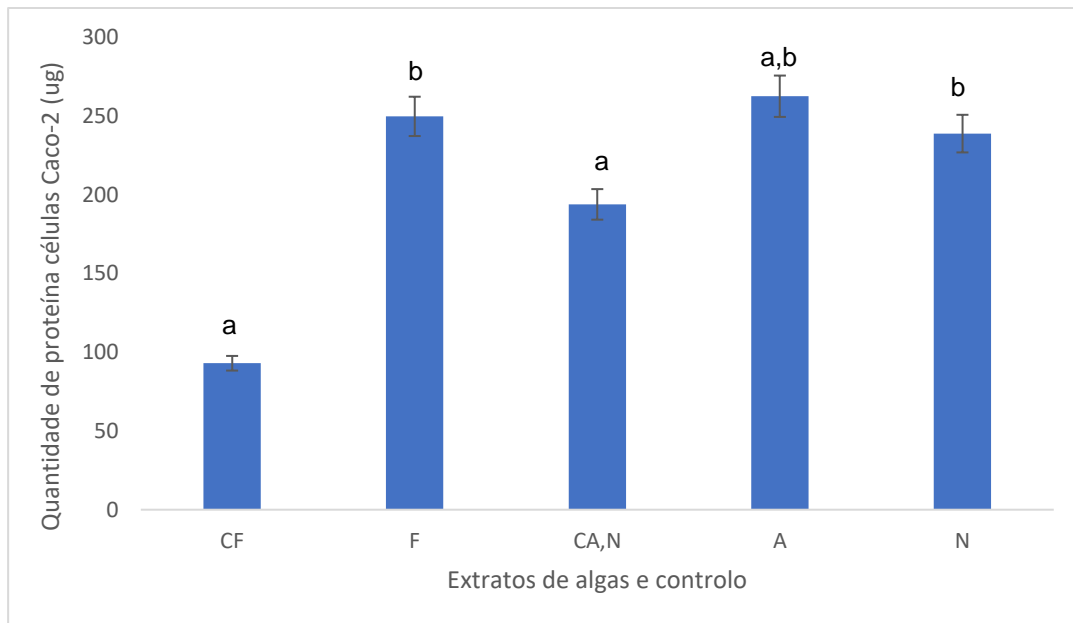


Figura 114- Quantidade de proteína, nas células Caco-2, em 150 µL de amostra. Onde CF é o controlo de Fucus; F é fucus; CA,N é o controlo de Aramé e Nori; A é Aramé e N é Nori. a e b são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.

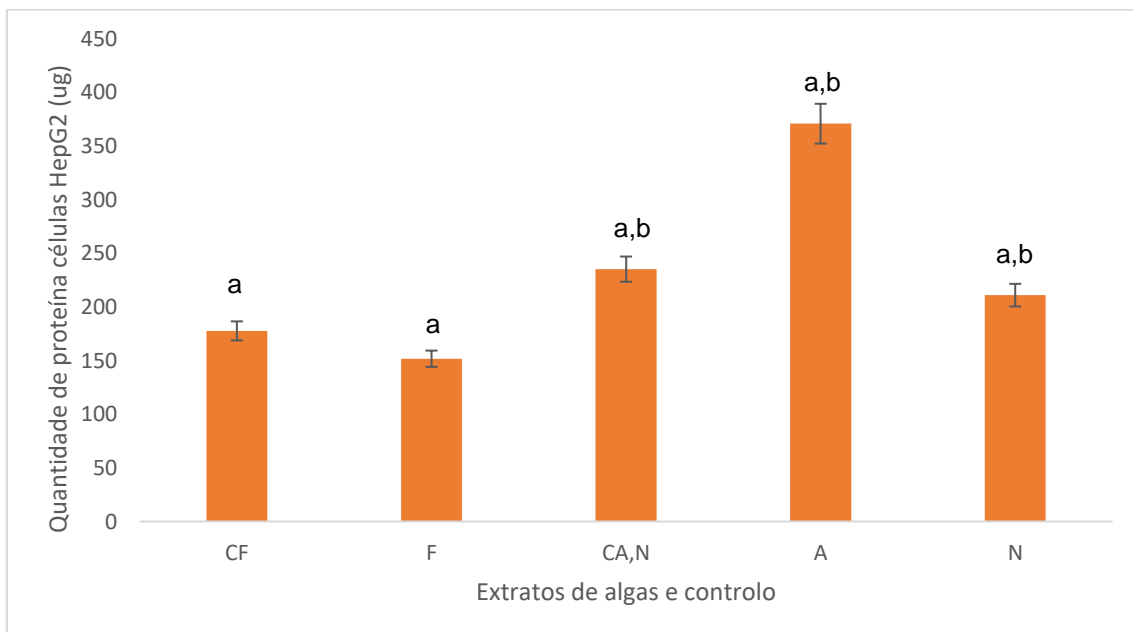


Figura 115 - Quantidade de proteína, nas células Hep-G2, em 150 µL de amostra. Onde CF é o controlo de Fucus; F é fucus; CA,N é o controlo de Aramé e Nori; A é Aramé e N é Nori. a e b são estatisticamente diferentes para um intervalo de confiança de 95 %.

3.5. SDS-PAGE

3.5.1. Caco-2

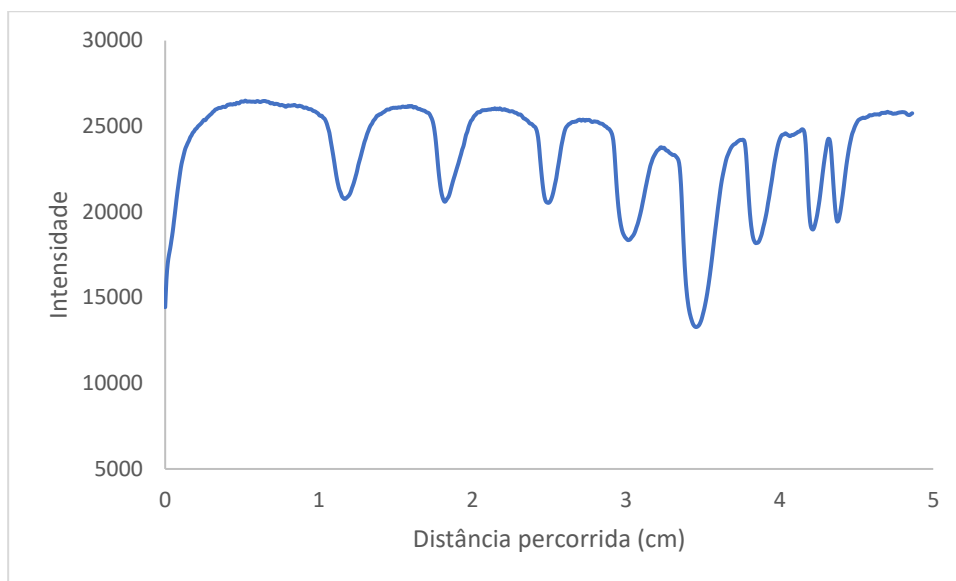


Figura 116 - Perfil das bandas presentes no Marcador do gel de SDS-PAGE obtido com as proteínas extraídas das células Caco-2.

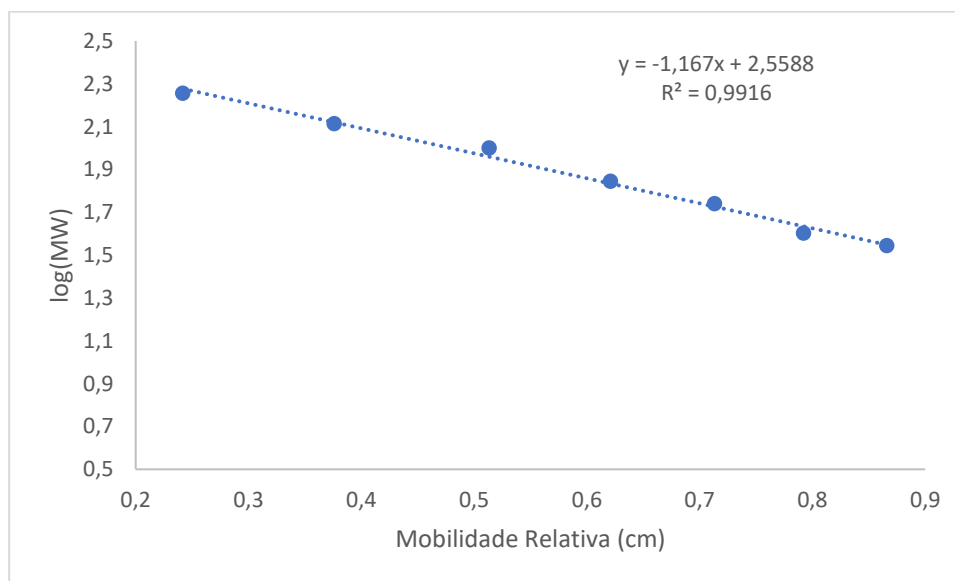


Figura 117 - Curva de calibração do marcador de proteínas do gel obtido a partir das células Caco-2.

Tabela 19 - Áreas obtidas para o controlo de Fucus (CF) e Fucus (F) e as respetivas áreas normalizadas, nas células Caco-2.

Bandas	CF	F	CF normalizado	F normalizado
1	201,82	180,456	0,0253	0,0137
2	720,347	689,477	0,0901	0,0525
3	48,435	751,497	0,0061	0,0572
4	62,021	1628,962	0,0078	0,1241

5	266,335	204,92	0,0333	0,0156
6	1513,569	112,556	0,1894	0,0086
7	0	1947,69	0,0000	0,1483
8	1909,669	2492,447	0,2390	0,1898
9	164,971	441,385	0,0206	0,0336
10	840,355	1269,062	0,1052	0,0967
11	293,678	410,142	0,0368	0,0312
12	936,426	1603,669	0,1172	0,1221
13	312,213	316,213	0,0391	0,0241
14	47,899	69,899	0,0060	0,0053
15	61,192	67,778	0,0077	0,0052
16	39,364	34,778	0,0049	0,0026
17	123,728	251,163	0,0155	0,0191
18	61,728	125,506	0,0077	0,0096
19	70,506	140,042	0,0088	0,0107
20	80,556	139,87	0,0101	0,0107
21	0	92,849	0,0000	0,0071
22	236,192	159,778	0,0296	0,0122

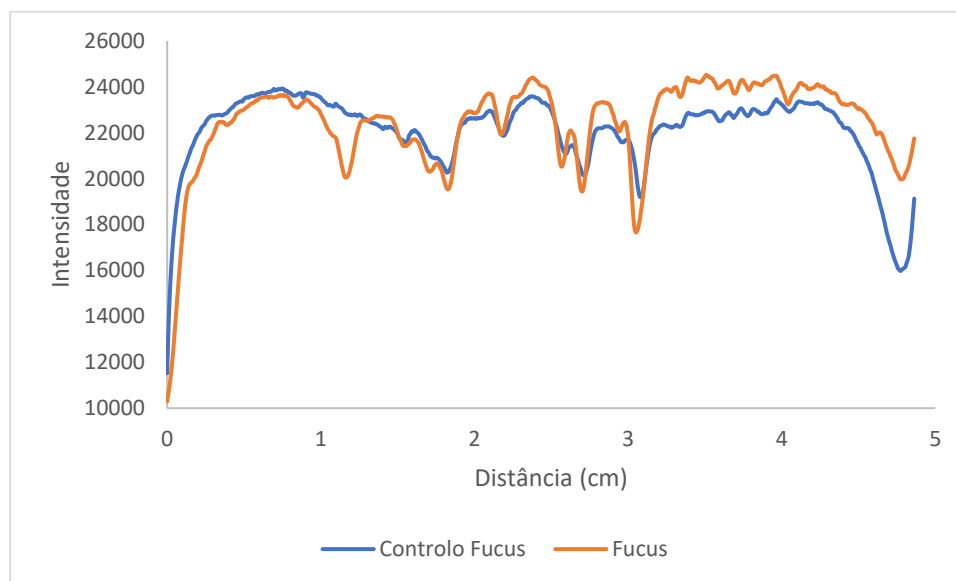


Figura 118 - Perfil das Bandas do controlo de Fucus e do Fucus, nas células Caco-2.

Tabela 20 – Áreas obtidas para o controlo de Aramé (CA) e Aramé (A) e as respetivas áreas normalizadas, nas células Caco-2.

Bandas	CA	A	CA normalizado	A normalizado
1	38,243	170,899	0,0043	0,0026
2	225,991	129,042	0,0253	0,0020
3	276,213	611,527	0,0309	0,0093

4	192,577	59224,59	0,0215	0,9052
5	61,899	158,163	0,0069	0,0024
6	308,82	67,728	0,0345	0,0010
7	120,971	238,092	0,0135	0,0036
8	190,092	68,021	0,0212	0,0010
9	201,728	202,456	0,0225	0,0031
10	341,456	68,607	0,0382	0,0010
11	401,627	343,163	0,0449	0,0052
12	2217,669	345,627	0,2478	0,0053
13	296,385	1773,941	0,0331	0,0271
14	0	48,192	0,0000	0,0007
15	1028,184	480,113	0,1149	0,0073
16	502,799	247,971	0,0562	0,0038
17	1268,376	397,184	0,1417	0,0061
18	81,142	109,849	0,0091	0,0017
19	94,728	87,607	0,0106	0,0013
20	100,899	61,899	0,0113	0,0009
21	73,021	67,192	0,0082	0,0010
22	55,485	62,485	0,0062	0,0010
23	165,627	121,678	0,0185	0,0019
24	172,213	126,92	0,0192	0,0019
25	144,142	0	0,0161	0,0000
26	190,92	106,506	0,0213	0,0016
27	198,778	107,778	0,0222	0,0016

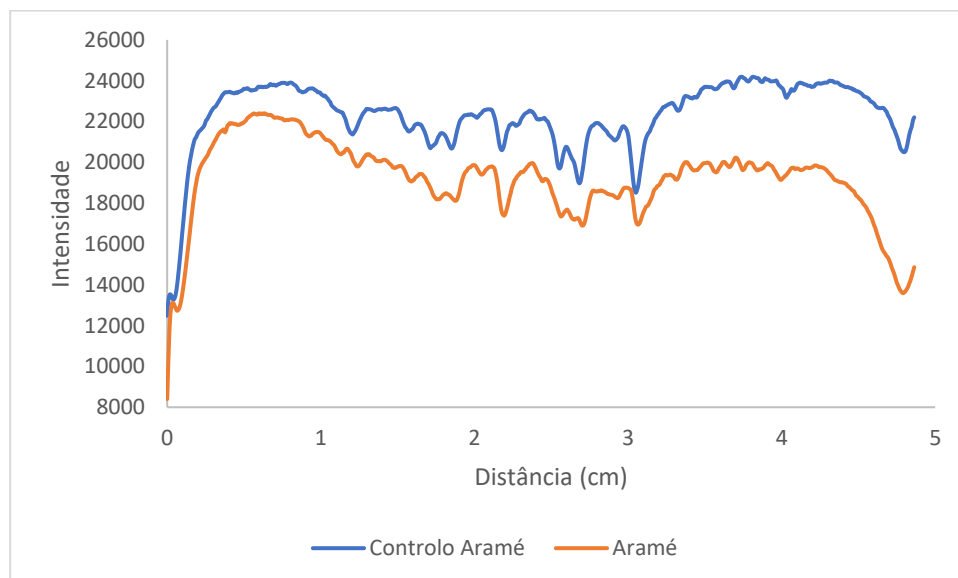


Figura 119 - Perfil das Bandas do controlo de Aramé e de Aramé, nas células Caco-2.

Tabela 21 - Áreas obtidas para o controlo de Nori (CN) e Nori (N) e as respetivas áreas normalizadas, nas células Caco-2.

Bandas	CN	N	CN normalizado	N normalizado
1	40,657	187,8990	0,0040	0,0240
2	192,87	356,991	0,0190	0,0456
3	190,385	351,092	0,0187	0,0449
4	601,619	515,083	0,0593	0,0658
5	1241,527	933,355	0,1223	0,1193
6	197,092	128,021	0,0194	0,0164
7	199,021	33,192	0,0196	0,0042
8	383,577	0	0,0378	0,0000
9	414,627	312,042	0,0408	0,0399
10	2251,376	1643,962	0,2217	0,2101
11	342,799	259,971	0,0338	0,0332
12	1015,891	785,648	0,1000	0,1004
13	564,213	563,627	0,0556	0,0720
14	1251,376	1084,548	0,1232	0,1386
15	125,385	20,364	0,0123	0,0026
16	103,263	68,021	0,0102	0,0087
17	88,485	83,607	0,0087	0,0107
18	81,142	35,778	0,0080	0,0046
19	45,778	51,899	0,0045	0,0066
20	149,799	106,556	0,0148	0,0136
21	173,213	111,799	0,0171	0,0143
22	107,092	176,213	0,0105	0,0225
23	187,213	0	0,0184	0,0000
24	205,485	14,828	0,0202	0,0019

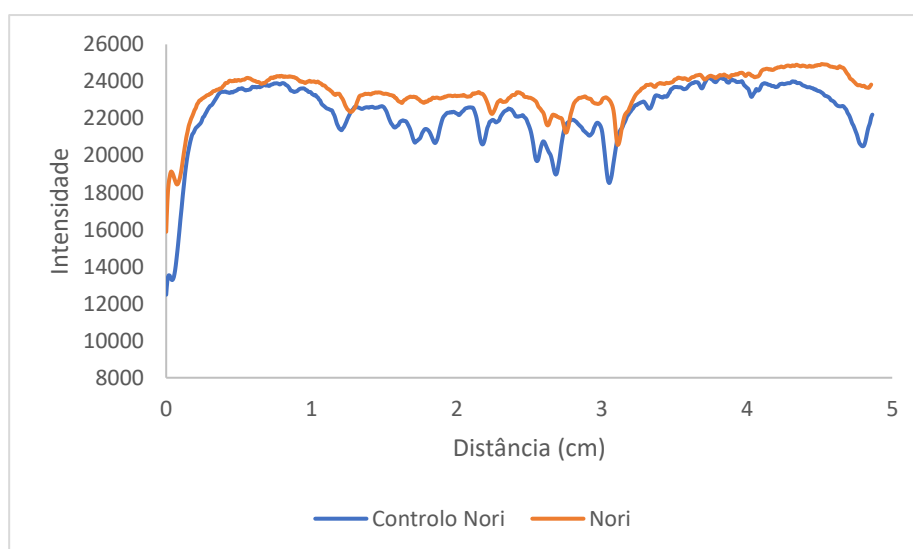


Figura 120 - Perfil das Bandas do controlo de Nori e de Nori, nas células Caco-2.

Tabela 22 - Resultados obtidos para as proteínas das células Caco-2 em contacto com os extratos de Aramé, Nori e Fucus.

	Distância (cm)	Rf	MW (kDa)
Aramé	1,199	0,247	186,62
	2,717	0,559	80,68
	3,329	0,685	57,53
	3,574	0,735	50,25
Nori	1,208	0,248	185,78
	2,024	0,416	118,36
	2,179	0,448	108,64
	3,558	0,731	50,71
	3,705	0,762	46,76
	3,786	0,778	44,69
Fucus	1,175	0,242	189,16
	1,559	0,32	153,04
	1,844	0,379	130,7
	2,195	0,451	107,67

3.5.2. HepG2

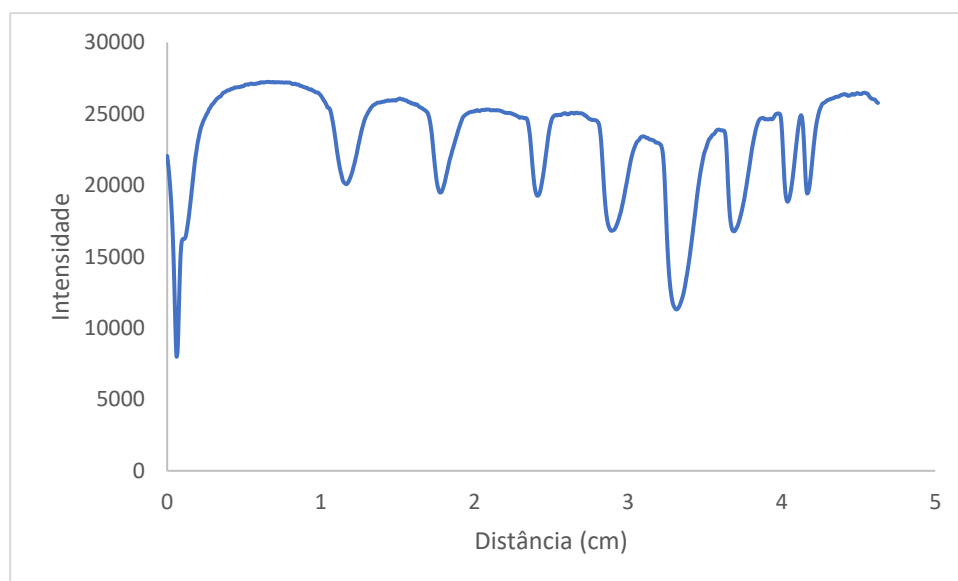


Figura 121 - Perfil das bandas presentes no Marcador do gel de SDS-PAGE obtido com as proteínas extraídas das células HepG2.

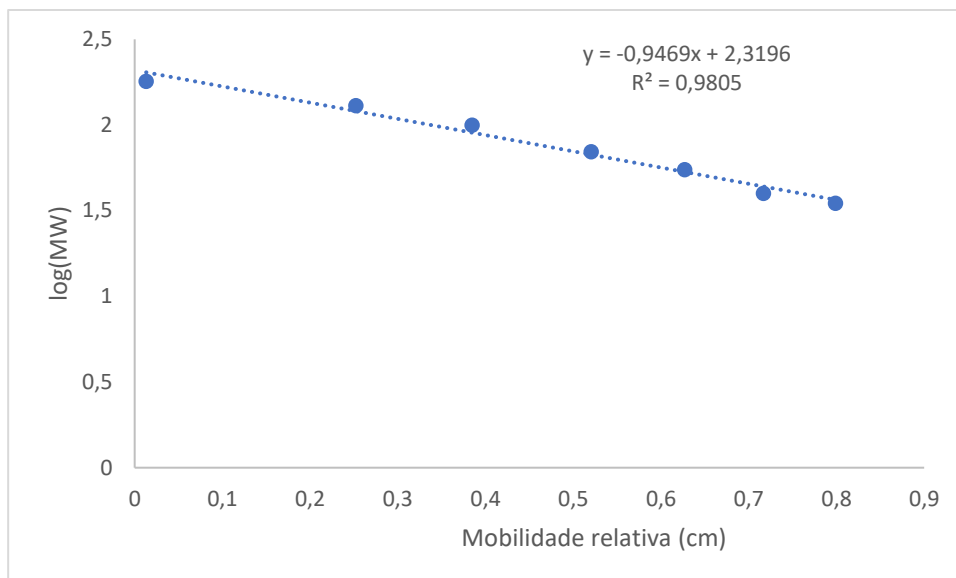


Figura 122 - Curva de calibração do marcador de proteínas do gel obtido a partir das células HepG2.

Tabela 23 - Áreas obtidas para o controlo de Fucus (CF) e Fucus (F) e as respetivas áreas normalizadas, nas células HepG2.

Bandas	CF	F	CF normalizado	F normalizado
1	157,971	203,042	0,0177	0,0740
2	140,092	57,021	0,0157	0,0208
3	202,991	0	0,0228	0,0000
4	226,163	68,485	0,0254	0,0250
5	263,284	33,95	0,0296	0,0124
6	224,678	0	0,0252	0,0000
7	87,314	36,364	0,0098	0,0133
8	27,364	2,414	0,0031	0,0009
9	322,477	12,536	0,0362	0,0046
10	310,213	26,192	0,0348	0,0095
11	2291,054	739,134	0,2573	0,2694
12	284,971	0	0,0320	0,0000
13	318,556	200,385	0,0358	0,0730
14	331,092	106,263	0,0372	0,0387
15	519,627	309,355	0,0584	0,1128
16	284,092	81,607	0,0319	0,0297
17	128,849	106,435	0,0145	0,0388
18	1594,217	70,314	0,1791	0,0256
19	1188,678	690,113	0,1335	0,2515

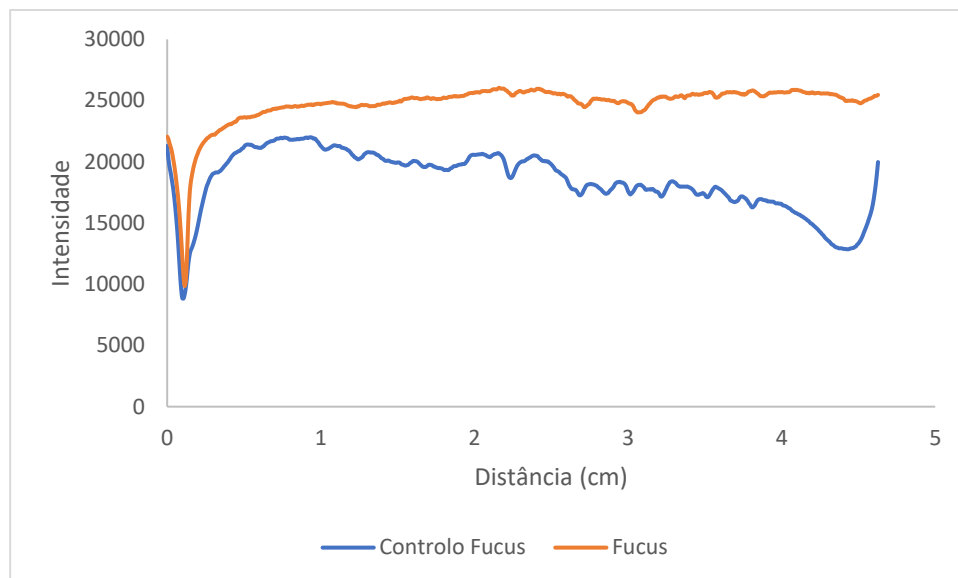


Figura 123 - Perfil das Bandas do controlo de Fucus e do Fucus, nas células HepG2.

Tabela 24 - Áreas obtidas para o controlo de Aramé (CA) e Aramé (A) e as respetivas áreas normalizadas, nas células HepG2.

Bandas	CA	A	CA normalizado	A normalizado
1	221,284	43,192	0,0386	0,0091
2	0	56,728	0,0000	0,0119
3	262,698	152,092	0,0458	0,0320
4	126,799	157,092	0,0221	0,0331
5	278,506	129,435	0,0486	0,0272
6	125,728	63,192	0,0219	0,0133
7	19,657	14,828	0,0034	0,0031
8	100,971	58,849	0,0176	0,0124
9	147,021	91,899	0,0256	0,0193
10	85,435	40,607	0,0149	0,0085
11	315,113	211,163	0,0550	0,0444
12	261,092	242,092	0,0456	0,0509
13	686,548	513,77	0,1198	0,1081
14	39,485	33,364	0,0069	0,0070
15	132,971	102,556	0,0232	0,0216
16	319,263	369,385	0,0557	0,0777
17	283,213	286,092	0,0494	0,0602
18	132,263	109,142	0,0231	0,0230
19	106,142	153,556	0,0185	0,0323
20	214,799	281,506	0,0375	0,0592
21	70,607	53,778	0,0123	0,0113
22	40,778	58,899	0,0071	0,0124
23	431,577	353,749	0,0753	0,0744
24	131,971	161,971	0,0230	0,0341

25	191,627	135,556	0,0334	0,0285
26	128,213	142,213	0,0224	0,0299
27	30,778	0	0,0054	0,0000
29	847,314	735,435	0,1478	0,1548

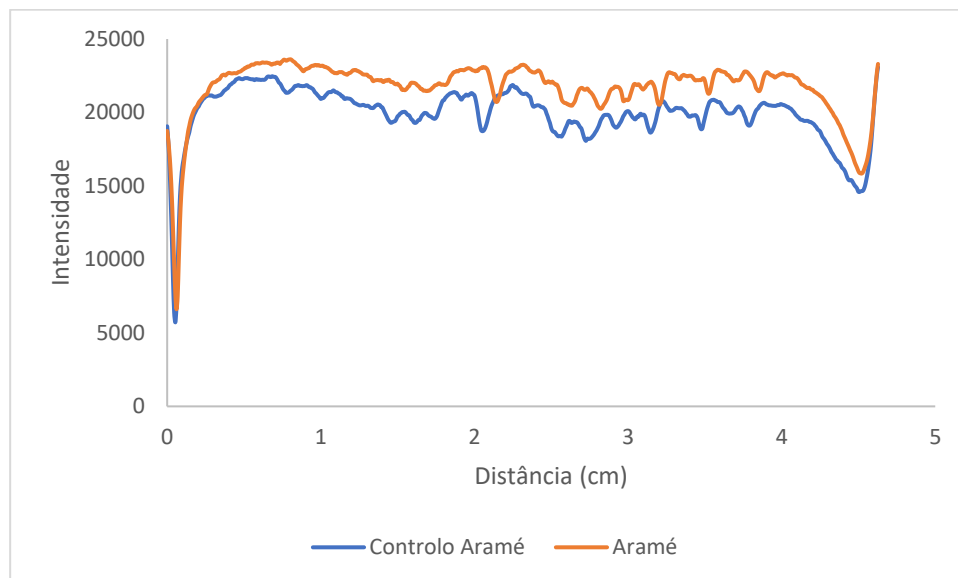


Figura 124 - Perfil das Bandas do controlo de Aramé e de Aramé, nas células HepG2.

Tabela 25 - Áreas obtidas para o controlo de Nori (CN) e Nori (N) e as respetivas áreas normalizadas, nas células HepG2.

Bandas	CN	N	CN normalizado	N normalizado
1	189,87	77,6780	0,0333	0,0161
2	262,698	94,506	0,0461	0,0195
3	116,385	69,021	0,0204	0,0143
4	290,213	201,506	0,0509	0,0416
5	121,728	154,849	0,0214	0,0320
6	17,364	0	0,0030	0,0000
7	91,971	94,142	0,0161	0,0195
8	147,021	68,728	0,0258	0,0142
9	75,435	54,142	0,0132	0,0112
10	287,698	134,678	0,0505	0,0278
11	332,92	334,042	0,0584	0,0690
12	623,719	631,305	0,1095	0,1305
13	39,485	41,899	0,0069	0,0087
14	126,263	47,899	0,0222	0,0099
15	302,556	429,263	0,0531	0,0887
16	278,385	279,385	0,0489	0,0577
17	127,263	156,971	0,0223	0,0324
18	105,142	124,556	0,0185	0,0257
19	268,627	273,92	0,0472	0,0566

20	214,87	256,749	0,0377	0,0531
21	425,577	360,163	0,0747	0,0744
22	104,142	124,263	0,0183	0,0257
23	177,213	170,92	0,0311	0,0353
24	122,506	104,556	0,0215	0,0216
25	847,314	553,435	0,1487	0,1144

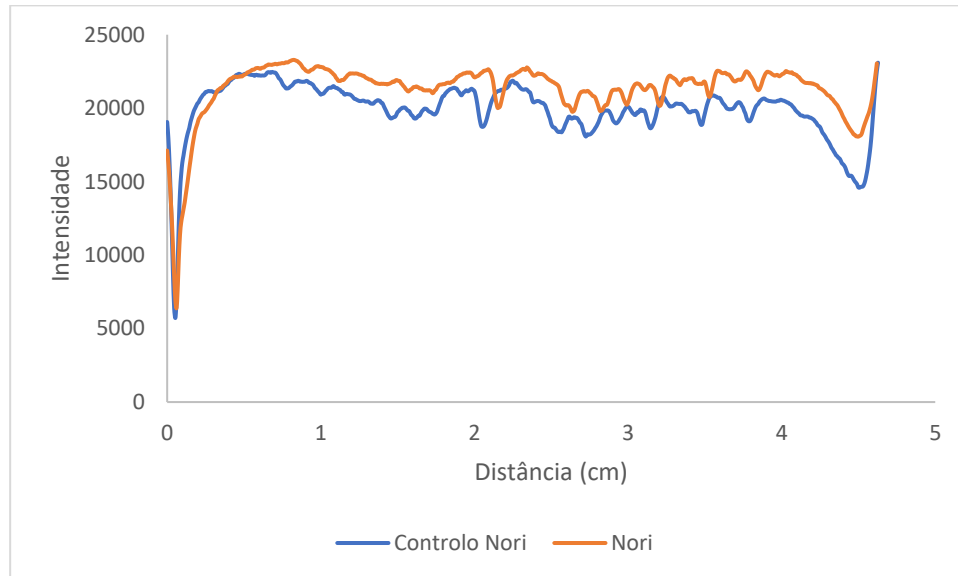


Figura 125 - Perfil das Bandas do controlo de Nori e de Nori, nas células HepG2.

Tabela 26 - Resultados obtidos para as proteínas das células Hep-G2 em contacto com os extratos de Aramé, Nori e Fucus.

	Distância (cm)	Rf	MW (kDa)
Aramé	0,265	0,057	184,23
	0,523	0,113	163,18
	2,075	0,448	78,52
	3,393	0,733	42,2
Nori	0,773	0,167	145,05
	1,644	0,355	96,23
	2,939	0,635	52,27
Fucus	0,341	0,074	177,77
	1,045	0,226	127,57
	1,734	0,375	92,19
	3,014	0,651	50,44
	3,022	0,653	50,26
	3,809	0,823	34,68

3.6. Western Blotting

3.6.1. Caco-2

Tabela 27 - Áreas obtidas para o controlo de Fucus (CF), Fucus (F), controlo de Nori e Aramé (CN,A), Aramé (A) e Nori (N) e as respetivas áreas normalizadas, para a proteína NPC1L1, nas células Caco-2.

	A	N	CN,A	F	CF
Áreas	6228	0	0	8182	5266
	1850	0	0	0	0
	1665	0	0	7562	6045
Áreas normalizadas	0,639	0	0	0,520	0,466
	0,190	0	0	0,000	0,000
	0,171	0	0	0,480	0,534

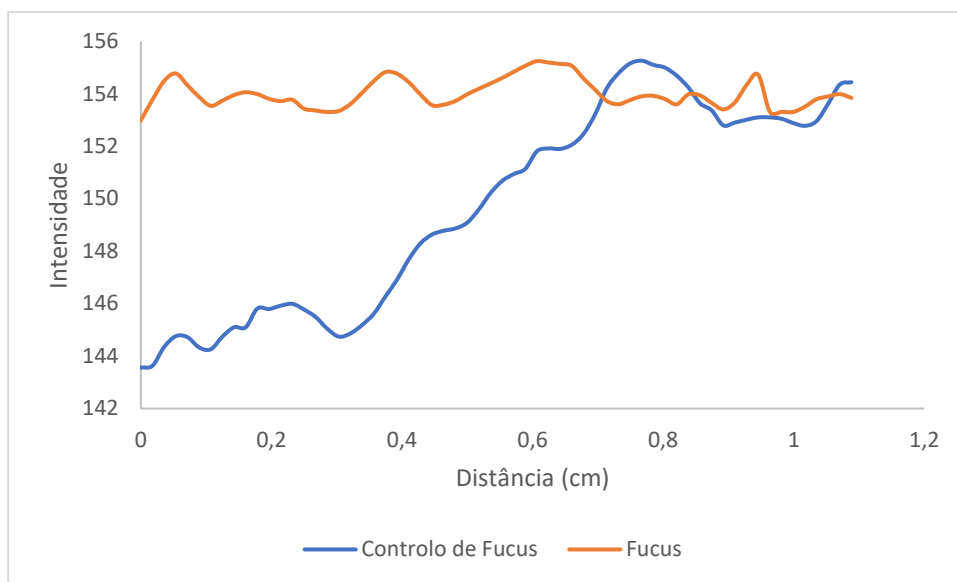


Figura 126 - Perfil das Bandas da NPC1L1 do controlo de Fucus e Fucus, nas células Caco-2.

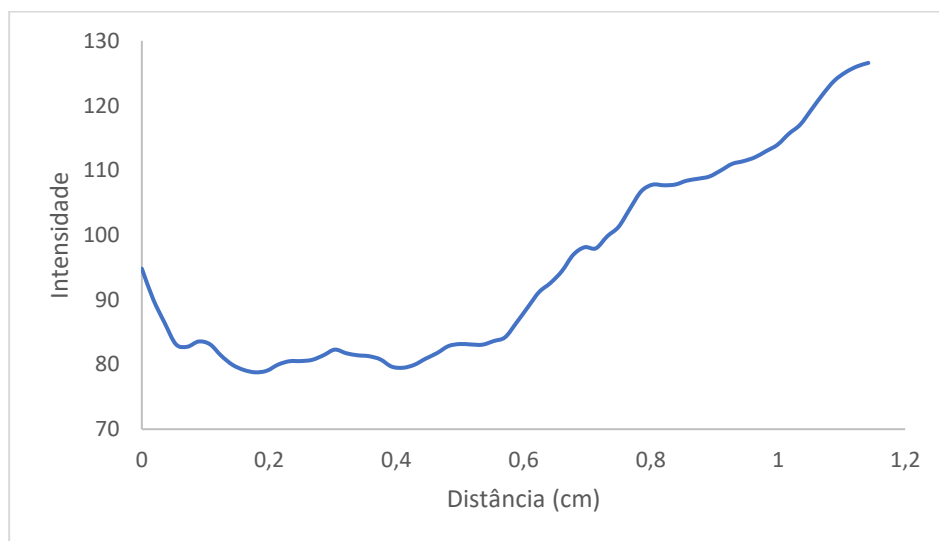


Figura 127 - Perfil das Bandas da NPC1L1 de Aramé, nas células Caco-2.

Tabela 28 - Áreas obtidas para o controlo de Fucus (CF), Fucus (F), controlo de Nori e Aramé (CN,A), Aramé (A) e Nori (N) e as respetivas áreas normalizadas, para a proteína ABCG5, nas células Caco-2.

	CF	F	CN,A	A	N
Áreas	17932	7739	22688	3886	2322
	18715	4896	27789	86574	24484
	2725	1293	5750	3279	3318
Áreas normalizadas	0,455	0,556	0,404	0,041	0,077
	0,475	0,351	0,494	0,924	0,813
	0,069	0,093	0,102	0,035	0,110

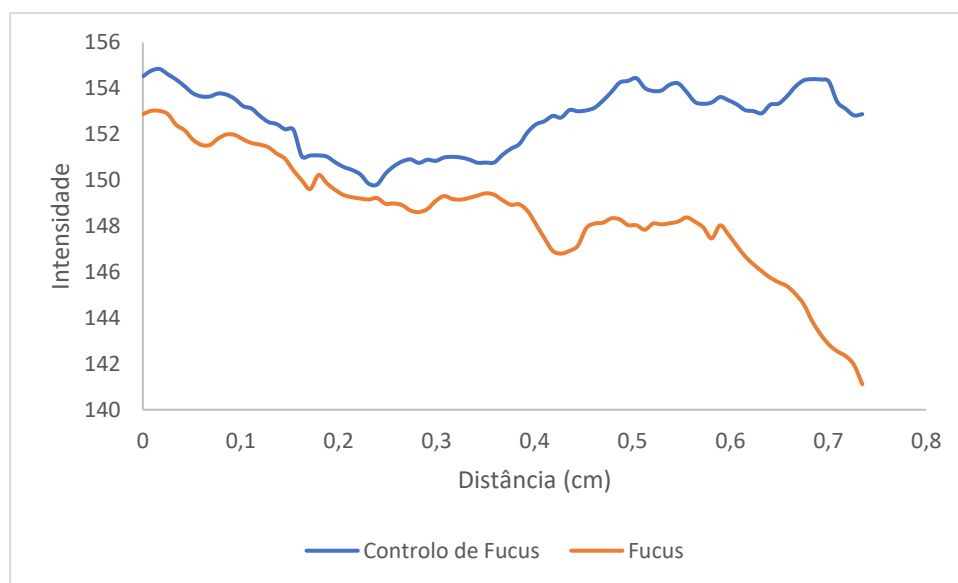


Figura 128 - Perfil das Bandas da ABCG5 do controlo de Fucus e Fucus, nas células Caco-2.

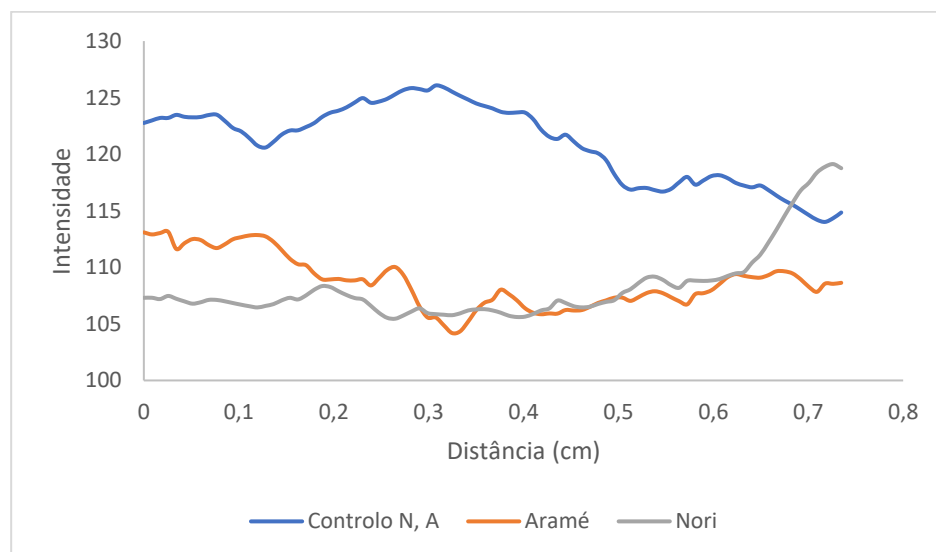


Figura 129 - Perfil das Bandas da ABCG5 do controlo de Nori e Aramé, Nori e Aramé, nas células Caco-2.

3.6.2. HepG2

Tabela 29 - Áreas obtidas para o controle de Fucus (CF), Fucus (F), controle de Nori e Aramé (CN,A), Aramé (A) e Nori (N) e as respectivas áreas normalizadas, para a proteína NPC1L1, nas células HepG2.

	CN,A	A	N	CF	F
Áreas	4397	16251	2509	8713	12371
	32972	24379	39828	8842	4637
Áreas normalizadas	0,118	0,400	0,059	0,496	0,727
	0,882	0,600	0,941	0,504	0,273

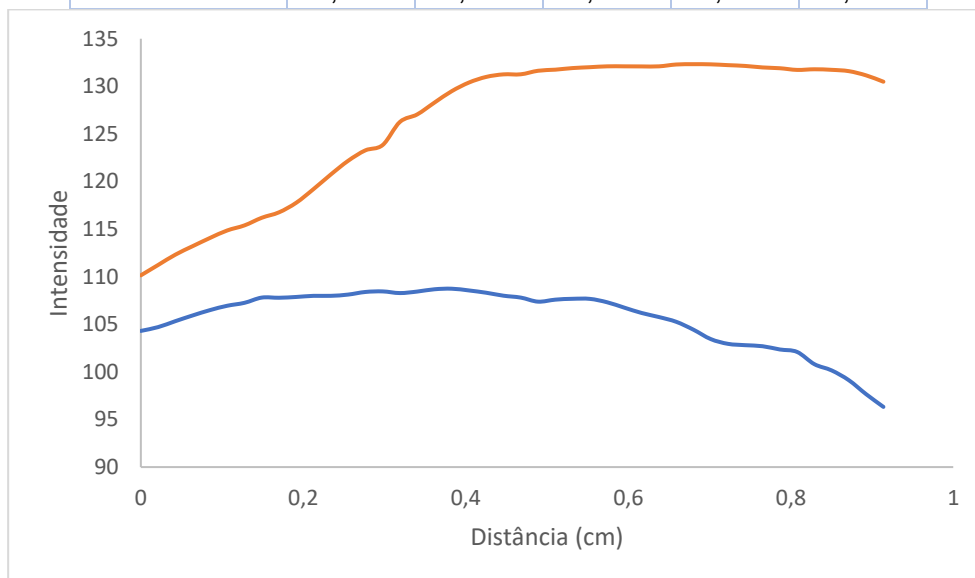


Figura 130 - Perfil das Bandas da NPC1L1 do controle de Fucus e Fucus, nas células HepG2.

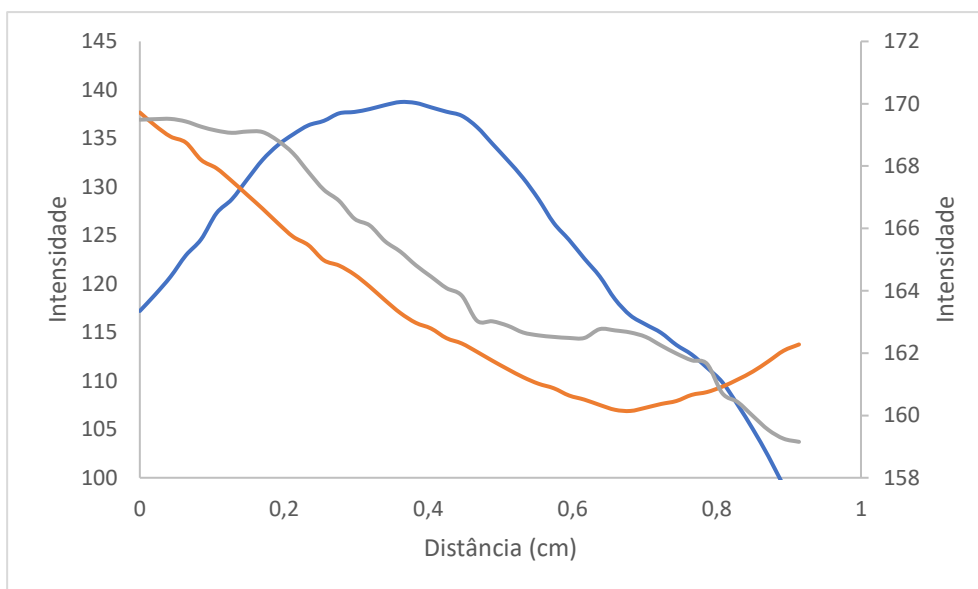


Figura 131 - Perfil das Bandas da NPC1L1 do controle de Nori e Aramé, Nori e Aramé, nas células HepG2.

Tabela 30 - Áreas obtidas para o controlo de Fucus (CF), Fucus (F), controlo de Nori e Aramé (CN,A), Aramé (A) e Nori (N) e as respetivas áreas normalizadas, para a proteína ABCG5, nas células HepG2.

	CN,A	A	N	CF	F
Áreas	0,306	0,211	12,819	0,953	0
	7,614	5,041	4,764	6,075	0
	23,68	18,597	2,843	14,826	1,904
	0,848	0,98	0,862	0,487	1,328
Áreas normalizadas	0,009	0,008	0,602	0,043	0
	0,235	0,203	0,224	0,272	0
	0,730	0,749	0,134	0,664	0,589
	0,026	0,039	0,040	0,022	0,411

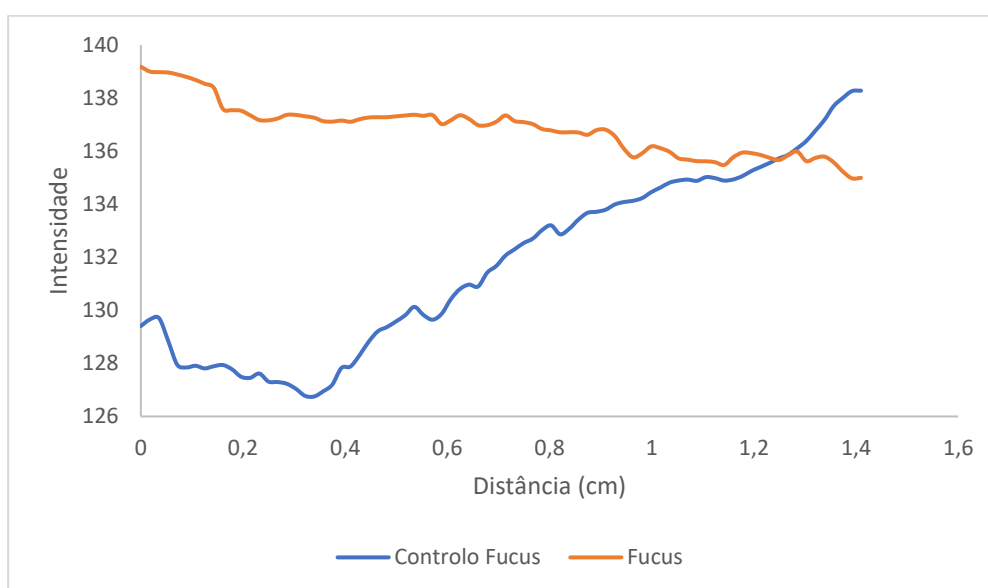


Figura 132 - Perfil das Bandas da ABCG5 do controlo de Fucus e Fucus, nas células HepG2.

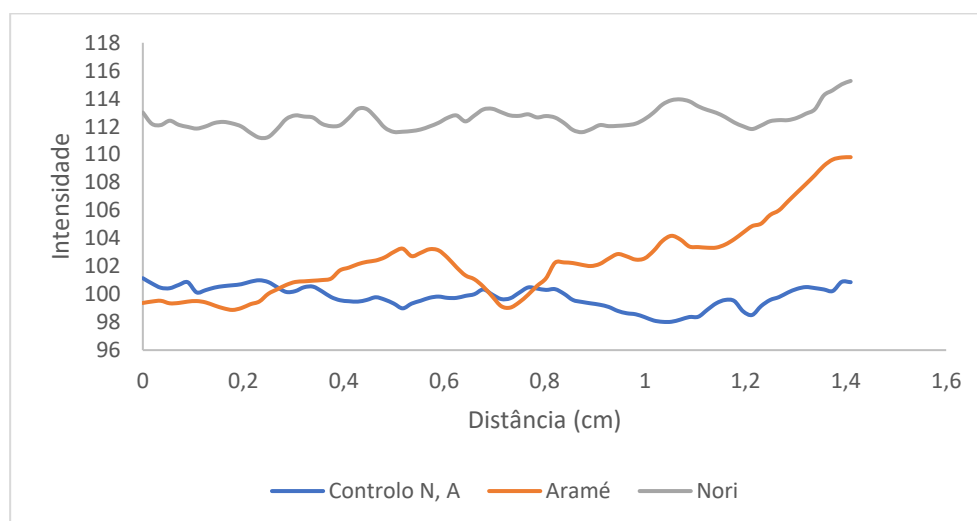


Figura 133 - Perfil das Bandas da ABCG5 do controlo de Nori e Aramé, Nori e Aramé, nas células HepG2.