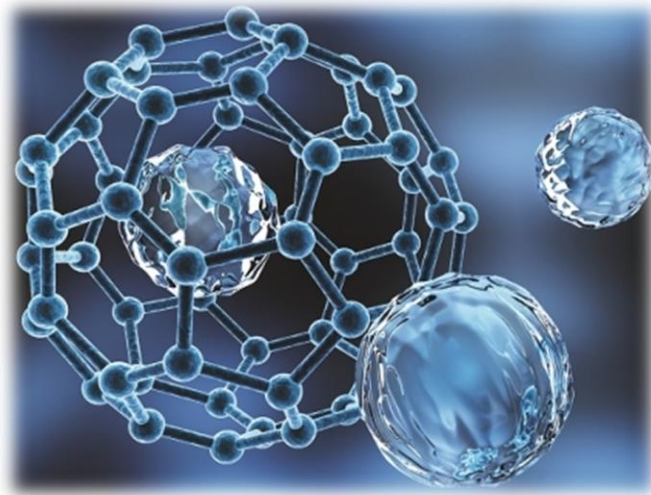




ISEL

INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA



Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

SOFIA ISABEL BRITES PINTO

(Licenciada em Engenharia Química e Biológica)

Trabalho Final de Mestrado para obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Química e Biológica

Orientadores:

Doutora Rita Isabel Dias Pacheco

Doutora Ana Catarina Beco Pinto Reis

Júri:

Presidente: Doutor José Augusto Paixão Coelho

Vogais:

Doutora Rita Isabel Dias Pacheco

Doutora Maria Manuela de Jesus Guilherme Gaspar

Doutora Ana Maria G. H. Barreiros Joanaz de Melo

Julho 2022

Agradecimentos

Um agradecimento muito especial às minhas orientadoras Professora Doutora Rita Pacheco e Professora Doutora Catarina Pinto Reis, pela excelente orientação, disponibilidade, paciência incessante e apoio, permitindo que a realização desta dissertação fosse possível.

Ao Instituto Superior de Engenharia de Lisboa (ISEL), e a todos os meus professores de Licenciatura e Mestrado, pelo conhecimento transmitido e pelo papel fundamental que tiveram no meu percurso académico. Do ISEL tenho também de agradecer a todos os colegas que me apoiaram e ajudaram a superar esta etapa, em especial aos meus colegas Tiago Cabrita, Mariana Coelho e Patrícia Duarte pela paciência, amizade e entre ajuda.

À Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (FCUL), onde desenvolvi parte da minha dissertação, gostaria de agradecer a todos os colegas pela simpatia e ajuda com as novas técnicas e equipamentos utilizados, um agradecimento especial à Laura Guedes, Rebeca Esperança e Rita Guedes. Da FCUL tenho também de agradecer à professora Doutora Lia Ascensão, pela ajuda e conhecimento transmitido no que se refere à análise morfológica das NPs.

À Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL), mais especificamente ao biotério, onde desenvolvi parte da minha dissertação, queria agradecer à Professora Doutora Manuela Gaspar, pelo auxílio e orientação no que respeita à análise das NPs e aos ensaios *in vivo*, ao Professor Doutor Pedro Faísca pela ajuda com as avaliações histológicas e a todos os colegas pela boa receção e ajuda com os ensaios *in vivo* realizados, um agradecimento especial à Joana Lopes, Tânia Gonçalves, Mariana Amaral e Inês Silvério.

Um agradecimento muito especial ao meu namorado Ailton Gonçalves pelo apoio na presença e até mesmo na ausência, pela paciência em todos os momentos, pela compreensão, pela força e pelo amor. E às minhas amigas Inês Correia, Patrícia Duarte, Joana Fernandes e Andreia Duarte, vocês têm um lugar especial no meu coração.

E por último, mas não menos importante, queria agradecer a toda a minha família e especialmente aos meus pais, a realização desta dissertação só foi possível graças ao apoio que me proporcionaram em todos os momentos, a eles devo este curso e o incentivo para continuar, sem dúvida foram e são a minha fonte de força, o meu suporte e o meu porto de abrigo.

Resumo

Os produtos naturais, principalmente compostos derivados de algas, apresentam atividades biológicas relevantes, podem ser auxiliares na prevenção de várias doenças, como diabetes, cancro e doenças cardiovasculares (CVDs) e explorados sobre o seu potencial de aplicação para tratamentos. Neste trabalho estudaram-se extratos aquosos das algas *Eisenia bicyclis* (Aramé), *Porphyra tenera* (Nori) e *Fucus vesiculosus* (Fucus), na prevenção da hipercolesterolemia, principal fator de risco associado às CVDs. Para tal, avaliou-se o conteúdo em fenóis pelo método *Folin-Ciocalteu*, polissacáridos pelo método fenol-ácido sulfúrico, proteínas utilizando o 2-D Quant Kit, atividade antioxidante pelo método 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), inibição das enzimas acetilcolinesterase (AChE) e 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase (HMGR), segurança *in vitro* com linhas celulares humanas do fígado e intestino e redução da permeação do colesterol utilizando um modelo celular que simula a barreira gastrointestinal. Nenhum dos extratos demonstrou ter citotoxicidade nas linhas celulares testadas. Dos extratos analisados, a Aramé demonstrou ter os melhores resultados em fenóis ($0,1521 \pm 0,0035$ mg equivalentes floroglucinol/mL extrato), atividade antioxidante (65 ± 3 %), inibição da HMGR (79 ± 7 %) e redução da permeação do colesterol (32 ± 2 %). Por conseguinte, a Aramé foi encapsulada em nanopartículas (NPs) de albumina de soro bovino (BSA) para melhorar as suas propriedades e facilitar a sua administração e absorção. As NPs Aramé apresentaram um tamanho inferior a 300 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,6 e carga superficial negativa. Da análise por microscopia eletrónica de varrimento inferiu-se que as NPs vazias e NPs Aramé apresentaram forma esférica. As NPs Aramé promoveram o aumento da redução da permeação de colesterol (51 ± 3 %) e maior inibição da AChE (66 ± 7 %) e HMGR (87 ± 4 %) relativamente ao extrato livre. No ensaio *in vivo* com ratos Wistar em que se administrou durante 4 semanas Aramé, Aramé com ezetimiba e NPs Aramé obteve-se um menor valor de colesterol para a Aramé (64 ± 2 % mg/dL), Aramé com ezetimiba (68 ± 2 % mg/dL) e NPs Aramé (72 ± 2 % mg/dL) relativamente ao controlo e a administração destes demonstrou ser segura, visto não se verificarem alterações histológicas a nível dos órgãos dos ratos. A administração de Aramé, NPs Aramé e Aramé com ezetimiba revelou alterações metabólicas no soro dos ratos relativamente aos ratos controlo, nomeadamente em metabolitos associados à diminuição do colesterol total e LDL-C e aumento do HDL-C, revelando o efeito da Aramé e NPs Aramé sobre a redução do colesterol. Concluiu-se assim que a alga Aramé demonstrou capacidade de redução do risco de CVDs, sendo este efeito mais evidente após encapsulação em NPs de BSA.

Palavras chave: *Eisenia bicyclis* (Aramé), *Porphyra tenera* (Nori), *Fucus vesiculosus* (Fucus), NPs de BSA, encapsulação de extrato, colesterol, CVDs.

Abstract

Natural products, mainly algae-derived compounds, exhibit relevant biological activities, can be considered an effective alternative in the prevention of various diseases such as diabetes, cancer, and cardiovascular diseases (CVDs), and are explored for their potential application in treatments. In this work, we studied *Eisenia bicyclis* (Arame), *Porphyra tenera* (Nori) and *Fucus vesiculosus* (Fucus) algae extracts to prevent hypercholesterolemia, the main risk factor associated with CVDs. To this aim, the extracts were evaluated for phenolic content by the *Folin-Ciocalteu* method, polysaccharides by the phenol-sulfuric acid method, proteins using the 2-D Quant Kit, antioxidant activity by the reduction of radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method, inhibition of enzymes, such as acetylcholinesterase (AChE), and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase (HMGR), *in vitro* safety using human liver and intestinal cells, and cholesterol reduction permeation using a cell line model that simulates the intestinal lining barrier. None of the extracts were shown to have cytotoxicity in the cell lines tested. Of the analyzed extracts, Arame was shown to have the best results in phenol content ($0,1521 \pm 0,0035$ mg phloroglucinol equivalents/mL extract), antioxidant activity (65 ± 3 %), HMGR inhibition (79 ± 7 %), and cholesterol permeation reduction (32 ± 2 %). Therefore, Arame was selected for encapsulation into bovine serum albumin (BSA) nanoparticles (NPs) to improve its properties and to facilitate administration and absorption. The Arame NPs showed a size below 300 nm, polydispersity index inferior to 0,6 and a negative surface charge. Through scanning electron microscopy analysis, it was inferred that empty NPs and Arame NPs showed a spherical shape. Arame NPs promoted an increased reduction of cholesterol permeation (51 ± 3 %) and a higher inhibition of AChE (66 ± 7 %) and HMGR (87 ± 4 %) when compared to the free extract. In the *in vivo* assay with Wistar rats Arame, Arame with ezetimibe, and Arame NPs were administered for 4 weeks, a lower cholesterol value was obtained for Arame (64 ± 2 % mg/dL), Arame with ezetimibe (68 ± 2 % mg/dL) and Arame NPs (72 ± 2 % mg/dL), compared with the control, and the administration of these proved to be safe, since there were no histological changes at the organs of the rats. The administration of Arame, Arame NPs, and Arame with ezetimibe, revealed metabolic changes in the serum of the rats relatively to the control rats, namely in metabolites associated with a decrease in total cholesterol and LDL-C, and increase in HDL-C, which evidenced the effect of Arame and Arame NPs on cholesterol lowering. It was therefore concluded that the Arame alga, demonstrated the capacity to reduce the risk of CVDs, with this effect being more evident after BSA NPs encapsulation.

Keywords: *Eisenia bicyclis* (Arame), *Porphyra tenera* (Nori), *Fucus vesiculosus* (Fucus), BSA NPs, extract encapsulation, cholesterol, CVDs.

Lista de Siglas

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ACAT2	Acil-Coenzima A Colesterol Aciltransferase 2
ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
AChI	Iodeto de Acetilcolina
ACN	Acetonitrilo
AD	Doença de Alzheimer
BSA	Albumina de Soro Bovino
C	Concentração
CETP	Proteína de Transferência de Ésteres de Colesterol
CVDs	Doenças Cardiovasculares
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
DTNB	5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico)
EC ₅₀	Concentração Efetiva de amostra que causa 50 % do efeito máximo
EE	Eficiência de Encapsulação
EPR	Efeito de Permeabilidade e Retenção
FBS	Soro de Bovino Fetal
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HDL	Lipoproteína de Densidade Elevada
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A
HMGR	Enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A Redutase
IC ₅₀	Concentração de Inibidor que causa 50 % de inibição
IDL	Lipoproteína de Densidade Intermédia
LDL	Lipoproteína de Densidade Baixa
LDLr	Recetor da Lipoproteína de Densidade Baixa
LPL	Lipoproteína Lípase
LXR	Recetor X do Fígado
MAAs	Aminoácidos do tipo micosporina
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-1-il) -2,5-difenil-tetrazólio
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Nicotinamida e Adenina
NP	Nanopartícula
NPC1L1	Proteína Niemann-Pick C1-Like 1
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCA	Análise de Componentes Principais
PE	Equivalente de Ácido Poligalacturónico
PGE	Equivalentes de Floroglucinol

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

PLS	Regressão por Projeção em Estruturas Latentes
RCT	Transporte Reverso do Colesterol
RNS	Espécies Reativas de Azoto
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio
SEM	Desvio padrão relativo em relação à média
SPE	Extração em Fase Sólida
SR-B1	<i>Scavenger Receptor</i> Classe B Tipo 1
TFA	Ácido Trifluoroacético
TNB	Ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano
VLDL	Lipoproteína de Densidade Muito Baixa

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo	II
Abstract	III
Lista de Siglas	IV
Índice.....	VI
Índice de Figuras	VIII
Índice de Tabelas	XIII
1. Introdução.....	1
1.1. Doenças Cardiovasculares	1
1.2. O Papel do Colesterol.....	2
1.2.1. Metabolismo do Colesterol.....	4
1.2.2. Proteínas Mediadoras da Circulação Entero-hepática do Colesterol.....	6
1.2.3. Terapêutica na Redução do Nível de Colesterol	7
1.3. Algas Marinhas.....	8
1.3.1. <i>Eisenia bicyclis</i> (Aramé).....	10
1.3.2. <i>Porphyra tenera</i> (Nori)	11
1.3.3. <i>Fucus vesiculosus</i>	11
1.4. Compostos e Atividades das Algas Marinhas	11
1.4.1. Polissacáridos.....	11
1.4.2. Compostos Fenólicos	13
1.4.3. Proteínas	14
1.5. Compostos antioxidantes e atividade antioxidante	15
1.6. Compostos Bioativos para a Inibição da Acetilcolinesterase.....	15
1.7. A Nanotecnologia como Estratégia para Melhorar a Atividade Biológica de Compostos Bioativos	17
2. Objetivos.....	21
3. Materiais e Métodos	22
3.1. Reagentes	22
3.2. Obtenção dos Extratos e Determinação do Rendimento de Produção.....	22
3.3. Caracterização dos Extratos e Amostras por HPLC-DAD	23
3.4. Quantificação dos Fenóis Totais.....	24
3.5. Quantificação das Proteínas Totais	25
3.6. Quantificação dos Polissacáridos Totais.....	26
3.7. Ensaio de Segurança <i>in vitro</i>	27
3.8. Atividade Antioxidante	29
3.9. Inibição da AChE	30
3.10. Inibição da HMGR.....	31

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

3.11.	Ensaio de Permeação na Barreira Gastrointestinal	32
3.12.	Preparação das NPs de BSA Contendo Extrato de Aramé	34
3.13.	Determinação da Eficiência de Encapsulação.....	34
3.14.	Liofilização das NPs e Rendimento de Produção.....	35
3.15.	Caracterização Morfológica das NPs de BSA	35
3.16.	Ensaio de Eficácia e Segurança <i>in vivo</i>	35
3.17.	Análise Metabólica do Soro dos Ratos por LC-QTOF-MS.....	37
3.18.	Análise de Dados	38
4.	Resultados e Discussão	39
4.1.	Obtenção dos Extratos de Algas.....	39
4.2.	Caracterização dos Extratos e Frações Purificadas.....	40
4.2.1.	Caracterização dos Extratos por HPLC-DAD.....	40
4.2.2.	Quantificação dos Fenóis Totais.....	44
4.2.3.	Quantificação das Proteínas Totais	45
4.2.4.	Quantificação dos Polissacáridos Totais.....	45
4.3.	Atividades Biológicas dos Extratos e Frações Purificadas	47
4.3.1.	Ensaio de Segurança <i>in vitro</i>	47
4.3.2.	Atividade Antioxidante	48
4.3.3.	Inibição da AChE.....	50
4.3.4.	Inibição da HMGR	51
4.3.5.	Ensaio de Permeação na Barreira Gastrointestinal.....	52
4.4.	Síntese e Caracterização das NPs de BSA	57
4.4.1.	Caracterização das NPs de BSA	57
4.5.	Atividades Biológicas das NPs de BSA.....	59
4.5.1.	Atividade Antioxidante das NPs de BSA.....	59
4.5.2.	Inibição da AChE pelas NPs de BSA.....	60
4.5.3.	Inibição da HMGR pelas NPs de BSA	60
4.5.4.	Redução na Permeação do Colesterol das NPs de BSA <i>in vitro</i>	61
4.5.5.	Ensaio de Segurança das NPs de BSA <i>in vitro</i>	63
4.5.6.	Ensaio de Eficácia e Segurança do Extrato de Aramé e NPs de BSA <i>in vivo</i>	64
4.5.7.	Análise do Soro dos Ratos por LC-QTOF-MS	74
5.	Conclusões e Perspetivas Futuras.....	82
6.	Referências Bibliográficas	84
7.	Anexos	108

Índice de Figuras

Figura 1 - Número anual de mortes devido a CVDs, por 100000 pessoas, extraído e adaptado de Our World in Data [13].	2
Figura 2 - Principais causas de morte em todo o mundo, em milhões de pessoas, extraído e adaptado de OMS [14].	2
Figura 3 - Estrutura química do colesterol, extraído de Yuan et al. [17].	3
Figura 4 - Estrutura geral de uma lipoproteína, extraído e adaptado de Moini [19].	3
Figura 5 - Via endógena e exógena do metabolismo lipídico. Apo: apolipoproteína, extraído e adaptado de Karam et al. [31,32].	5
Figura 6 - Biossíntese do Colesterol, extraído e adaptado de Cortes et al. [15].	6
Figura 7 - Papel da proteínas transportadoras do colesterol NPC1L1 e ABCG5/G8 na circulação entero-hepática do colesterol. FC: colesterol livre; BA: ácidos biliares; PL: fosfolípidos; CE: ésteres de colesterol; LDLR: recetor da LDL; SR-B1: scavenger receptor classe B tipo 1, extraído e adaptado de Ko et al. [34,35].	7
Figura 8 - Classificação taxonómica das algas marinhas com base na sua pigmentação, extraído e adaptado de Collins et al. [59].	9
Figura 9 - Propriedades biológicas das algas marinhas já demonstradas em variados estudos, extraído e adaptado de Peñalver et al. [56].	10
Figura 10 - Estrutura da laminaria, extraído e adaptado de Ozanne et al. [95].	12
Figura 11 - Estrutura do fucoídano, extraído e adaptado de Ahmed et al. [103].	12
Figura 12 - Estrutura do porfirano, extraído e adaptado de Pierre et al. [107].	13
Figura 13 - Estrutura química do floroglucinol, extraído de Erpel et al. [109].	14
Figura 14 - Estrutura química do ecol, fucofloroetol e fucol, extraído e adaptado de Junge et al. e Erpel et al. [72,109].	14
Figura 15 - Transmissão do impulso nervoso nos neurónios e o papel da acetilcolinesterase, extraído e adaptado de Vecchio et al. [146,148].	16
Figura 16 - Estrutura de uma nanoesfera e nanocápsula, extraído e adaptado de Suffredini et al. [168].	17
Figura 17 - Formas adotadas pelas NPs, extraído e adaptado de Hamida et al. [169].	18
Figura 18 - NPs orgânicas e inorgânicas na entrega de fármacos, extraído e adaptado de Briolay et al. [170].	19
Figura 19 - Mecanismo reacional da redução do reagente <i>Folin-Ciocalteu</i> através da oxidação de compostos fenólicos presentes na amostra em estudo, extraído e adaptado de Ford et al. [192].	25
Figura 20 - Esquema reacional do método ácido-fenol sulfúrico na determinação dos polissacáridos totais presentes na amostra em estudo, extraído e adaptado de Viel et al. [198].	26
Figura 21 - Reação de redução do MTT a formazan, extraído e adaptado de Grela et al. [202].	28
Figura 22 - Mecanismo reacional do radical livre DPPH com um redutor antioxidante (AH) presente na amostra em estudo, extraído e adaptado de Teixeira et al. [205,206].	29

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Figura 23 - Mecanismo reacional do ensaio de Ellman para a determinação da atividade da AChE, extraído e adaptado de Worek <i>et al.</i> [210].	30
Figura 24 - Reação catalisada pela HMG-CoA redutase, extraído e adaptado de Son <i>et al.</i> [212].	31
Figura 25 - Representação esquemática do modelo do intestino in vitro com as células da linha celular Caco-2, extraído e adaptado de Maares <i>et al.</i> [213].	33
Figura 26 - Cromatogramas totais (250-600 nm) representativos do extrato de (A) Aramé 1 mg/mL e frações purificadas (B) Aramé metanol 5 mg/mL e (C) Aramé água 5 mg/mL.	40
Figura 27 - Cromatogramas totais (250-600 nm) representativos do extrato de (A) Nori 1 mg/mL e frações purificadas (B) Nori metanol 5 mg/mL e (C) Nori água 5 mg/mL.	41
Figura 28 - Cromatogramas totais (250-600 nm) representativos do extrato de (A) Fucus 1 mg/mL e frações purificadas (B) Fucus metanol 5 mg/mL e (C) Fucus água 5 mg/mL.	42
Figura 29 - Cromatogramas representativos dos extratos de (A) Aramé, (B) Nori e (C) Fucus, para uma concentração de 1 mg/mL e do (D) Floroglucinol (5 mg/mL), para um comprimento de onda de 266 nm.	43
Figura 30 - Quantidade de fenóis totais determinada para os extratos de Aramé (10 mg/mL), Nori (10 mg/mL), Fucus (11,77 mg/mL) e frações purificadas metanol e água (10 mg/mL), com o respetivo desvio padrão. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	44
Figura 31 - Quantificação de polissacáridos totais determinada para os extratos de Aramé (2,5 mg/mL), Nori (2,5 mg/mL) e Fucus (5,89 mg/mL), frações purificadas Aramé metanol (5 mg/mL), Nori metanol (2,5 mg/mL) e Fucus metanol (10 mg/mL) e frações purificadas água (5 mg/mL), com o respetivo desvio padrão. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	46
Figura 32 - Viabilidade celular das HepG2 quando em contato com os extratos de Aramé, Nori e Fucus e frações purificadas Aramé e Nori, para a concentração de 1 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	47
Figura 33 - Viabilidade celular das Caco-2 quando em contato com o extrato de Aramé, Nori e Fucus e frações purificadas Aramé e Nori, para a concentração de 1 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	48
Figura 34 - Atividade antioxidante determinada para os extratos de Aramé (0,25 mg/mL), Nori (0,25 mg/mL), Fucus (0,29 mg/mL) e frações purificadas metanol e água (0,25 mg/mL), com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	49
Figura 35 - Inibição da AChE para os extratos de Aramé (3 mg/mL), Nori (1,5 mg/mL) e Fucus (1,177 mg/mL) e amostra de floroglucinol (0,1 mg/mL), com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	50

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Figura 36 - Inibição da HMGR para a amostra de pravastatina e diferentes extratos em estudo, para uma concentração de extrato de Aramé, Nori e Fucus de 0,25 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	52
Figura 37 - Redução da permeação do colesterol para a ezetimiba e diferentes extratos em estudo, tendo a solução de colesterol no basolateral como o 100% da permeação, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	53
Figura 38 - Permeação dos compostos bioativos dos extratos em estudo, tendo a solução do basolateral da respetiva alga como o 100% de permeação, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).....	55
Figura 39 - Microscopia Eletrónica de Varrimento das (A) NPs vazias (1 μ m) e (B) NPs Aramé (1 μ m).	58
Figura 40 - Atividade antioxidante do extrato de Aramé e das NPs Aramé, para uma concentração de 0,25 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	59
Figura 41 - Inibição da AChE para o extrato de Aramé, NPs vazias e NPs Aramé, para uma concentração de 3 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).....	60
Figura 42 - Inibição da HMGR para o extrato de Aramé, NPs vazias e NPs Aramé, para uma concentração de 0,25 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).....	61
Figura 43 - Redução da permeação do colesterol para a ezetimiba, extrato de Aramé, NPs vazias e NPs Aramé, tendo a solução de colesterol como o 100% da permeação, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	62
Figura 44 - Permeação dos compostos bioativos do extrato de Aramé e das NPs Aramé, tendo a solução do basolateral do extrato de Aramé e NPs Aramé sem colesterol como o 100% de permeação, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	63
Figura 45 - Viabilidade celular das (A) Caco-2 e (B) HepG2, quando colocadas em contato com NPs vazias e NPs Aramé, para a concentração de 1 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).....	64
Figura 46 - Variação da ração consumida para cada grupo de teste. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	65
Figura 47 - Variação do (A) peso e (B) glicémia para cada grupo de teste na quinta semana de ensaio. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).....	66

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Figura 48 - Valores de colesterol e ureia obtidos para os diferentes grupos de ratos, após 5 semanas de ensaio. Os valores encontram-se representados como média \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).....	67
Figura 49 - Variação da ração consumida para cada grupo de teste. Os valores encontram-se representados pela média.....	69
Figura 50 - Variação do (A) peso e (B) glicémia para cada grupo de teste na quarta semana. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).....	69
Figura 51 - Valores de colesterol e ureia obtidos para os diferentes grupos de ratos, após 4 semanas de ensaio. Os valores encontram-se representados como média \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).....	70
Figura 52 - Representação histológica do (A) fígado do grupo de controlo, (B) fígado do grupo em que se administrou extrato de Aramé, (C) fígado do grupo em que se administrou ezetimiba e extrato de Aramé e (D) fígado do grupo em que se administrou NPs de BSA com extrato de Aramé.....	72
Figura 53 - Representação histológica do (A) rim do grupo de controlo, (B) rim do grupo em que se administrou extrato de Aramé, (C) rim do grupo em que se administrou ezetimiba e extrato de Aramé e (D) rim do grupo em que se administrou NPs de BSA com extrato de Aramé.....	73
Figura 54 - Representação histológica do (A) baço do grupo de controlo, (B) baço do grupo em que se administrou extrato de Aramé, (C) baço do grupo em que se administrou ezetimiba e extrato de Aramé e (D) baço do grupo em que se administrou NPs de BSA com extrato de Aramé.....	74
Figura 55 - Representação gráfica: (A) PLS, (B) Volcano, (C) PCA e (D) Compostos identificados, para o soro do rato do controlo e soro do rato em que foi administrado extrato.....	76
Figura 56 - Representação gráfica: (A) PLS, (B) Volcano, (C) PCA e (D) Compostos identificados, para o soro do rato do controlo e soro do rato em que foi administrado NPs extrato.....	77
Figura 57 - Representação gráfica: (A) PLS, (B) Volcano, (C) PCA e (D) Compostos identificados, para o soro do rato do controlo e soro do rato em que foi administrado ezetimiba.....	79
Figura 58 - Representação gráfica: (A) PLS, (B) Volcano, (C) PCA e (D) Compostos identificados, para o soro do rato do controlo e soro do rato em que foi administrado extrato + ezetimiba.....	80
Figura Anexo 1 - Espectro UV-vis do floroglucinol, utilizado na seleção do comprimento de onda de análise.....	108
Figura Anexo 2 - Reta de calibração usada na determinação da concentração de fenóis totais presentes nos extratos de Aramé, Nori e Fucus, a 760 nm.....	108
Figura Anexo 3 - Reta de calibração usada na determinação da quantidade de proteínas presentes nos extratos de Aramé, Nori e Fucus, em que existe a variação da absorvância a 480 nm corrigida com a quantidade de BSA.....	109
Figura Anexo 4 - Reta de calibração usada na determinação da concentração de polissacáridos totais presentes nos extratos de Aramé, Nori e Fucus, a 490 nm.....	109

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Figura Anexo 5 - Valores médios de viabilidade celular das HepG2 quando em contato com os extratos de Aramé, Nori e Fucus e frações purificadas Aramé e Nori, para as concentrações de 0,5 e 1 mg/mL, com o respetivo desvio padrão. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	110
Figura Anexo 6 - Valores médios de viabilidade celular das Caco-2 quando em contato com o extrato de Aramé, Nori e Fucus e frações purificadas Aramé e Nori, para as concentrações de 0,5 e 1 mg/mL, com o respetivo desvio padrão. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	110
Figura Anexo 7 - Reta de calibração usada na determinação da concentração de extrato de Aramé que apresenta uma atividade antioxidante de 50% (EC_{50}), em que existe a variação da atividade antioxidante com a concentração de Aramé.	111
Figura Anexo 8 - Cromatograma usado na determinação da EE das NPs de BSA com 10 mg de extrato de Aramé encapsulado.	111
Figura Anexo 9 - Cromatograma usado na determinação da EE das NPs de BSA com 25 mg de extrato de Aramé encapsulado.	112
Figura Anexo 10 - Cromatograma usado na determinação da EE das NPs de BSA com 50 mg de extrato de Aramé encapsulado.	112
Figura Anexo 11 - Viabilidade celular das (A) Caco-2 e (B) HepG2, quando colocadas em contato com NPs vazias e NPs de Aramé, para as concentrações de 0,5 e 1 mg/mL, com o respetivo desvio padrão. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).	113
Figura Anexo 12 - Variação da ração consumida para cada grupo de teste referente ao primeiro ensaio in vivo. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).....	115
Figura Anexo 13 - Variação da glicémia para cada grupo de teste referente ao primeiro ensaio in vivo. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).....	115
Figura Anexo 14 - Variação do peso para cada grupo de teste referente ao segundo ensaio in vivo. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).....	116
Figura Anexo 15 - Variação da glicémia para cada grupo de teste referente ao segundo ensaio in vivo. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).....	116

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Método utilizado na obtenção dos cromatogramas dos extratos e frações purificadas das algas e das NPs em estudo.	24
Tabela 2 - Método utilizado na avaliação por LC-MS.	38
Tabela 3 - Determinação do rendimento para os extratos secos recuperados após extração aquosa a partir da biomassa de algas.	39
Tabela 4 - Determinação do rendimento após a purificação por SPE das frações purificadas metanol.	39
Tabela 5 - Determinação do rendimento após a purificação por SPE das frações purificadas água.	39
Tabela 6 – Resumo dos principais valores obtidos para os ensaios efetuados, com o respetivo desvio padrão. Letras diferentes num mesmo ensaio indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras.	56
Tabela 7 - Valores médios de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das NPs vazias e NPs Aramé, com o respetivo desvio padrão.	57
Tabela 8 - Valores médios de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das NPs vazias e NPs Aramé após a sua liofilização, com o respetivo desvio padrão.	58
Tabela 9 - Índice tecidual do fígado, rim e baço para cada grupo de teste. Os valores encontram-se representados como média \pm SEM.	68
Tabela 10 - Índice tecidual do fígado, rim e baço para cada grupo de teste. Os valores encontram-se representados como média \pm SEM.	71
Tabela Anexo 1 - Determinação dos principais elementos presentes na urina de cada grupo nas 5 semanas de teste, N=negativo.	114

1. Introdução

1.1. Doenças Cardiovasculares

A esperança média de vida está a aumentar a nível mundial e a mudança demográfica é cada vez mais visível [1], isto é, prevê-se, que até 2050, o número de indivíduos com mais de 80 anos quadruplicará [2]. Este aumento da esperança média de vida vem com desafios significativos no que respeita à manutenção do estado de saúde da população, como forma de mantê-la livre de doenças e no que respeita ao envelhecimento ativo, ou seja, na procura pelo bem-estar físico, social e mental da população em envelhecimento, bem como a sua participação ativa na sociedade [2,3].

A idade desempenha um papel vital na deterioração da funcionalidade cardiovascular, resultando num aumento do risco de doenças cardiovasculares (CVDs) nos adultos mais velhos (≥ 50 anos de idade). As CVDs são um grupo de distúrbios do coração e dos vasos sanguíneos, vulgarmente referidas como doenças cardíacas e acidentes vasculares cerebrais [4]. Estas doenças encontram-se relacionadas com o aumento da concentração plasmática de lipoproteínas e lípidos, como os triglicéridos e o colesterol [5]. Estudos apontam que a prevalência das CVDs aumenta com a idade, tanto em homens como em mulheres [6]. E, embora as mulheres tenham geralmente uma incidência de CVDs inferior à dos homens, evidências clínicas demonstraram que as mulheres têm uma taxa de mortalidade mais elevada e um prognóstico mais reservado após um evento cardiovascular agudo [7].

A incidência e prevalência de CVDs nos jovens adultos (18-45 anos) também demonstra ser um motivo de preocupação crescente, pois tem vindo a aumentar nas últimas décadas, em especial no mundo ocidental. Acredita-se que tal é devido à adoção de fatores de risco cada vez mais prejudiciais para a saúde, incluindo a inatividade física, dieta pobre e/ou pouco saudável e, conseqüentemente, a obesidade [8].

A hipercolesterolemia é um dos principais fatores de risco associado às CVDs [9,10] e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), esta é a principal causa de mortalidade, quer nos países industrializados quer nos países em desenvolvimento. Em 2019, cerca de 17,6 milhões de pessoas morreram de CVDs (Figura 1), representando 32 % de todas as mortes registadas no mundo. Cerca de 85 % destas mortes deveram-se a ataques cardíacos e a acidentes vasculares cerebrais [11] (Figura 2). No que diz respeito a Portugal, as CVDs contribuíram em 28 % das mortes em 2020 [12].

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

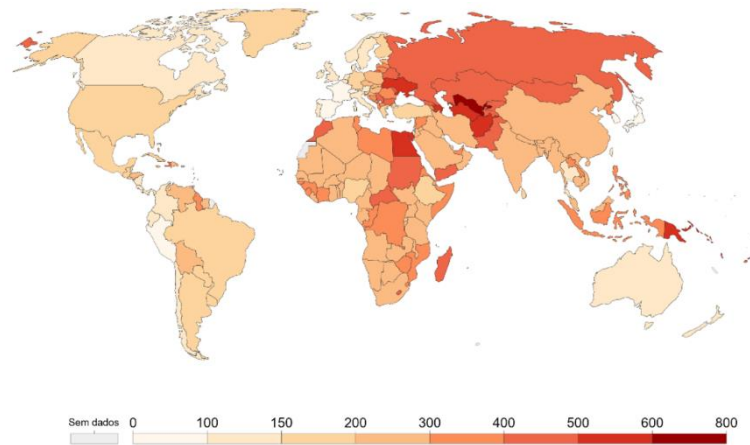


Figura 1 - Número anual de mortes devido a CVDs, por 100000 pessoas, extraído e adaptado de *Our World in Data* [13].

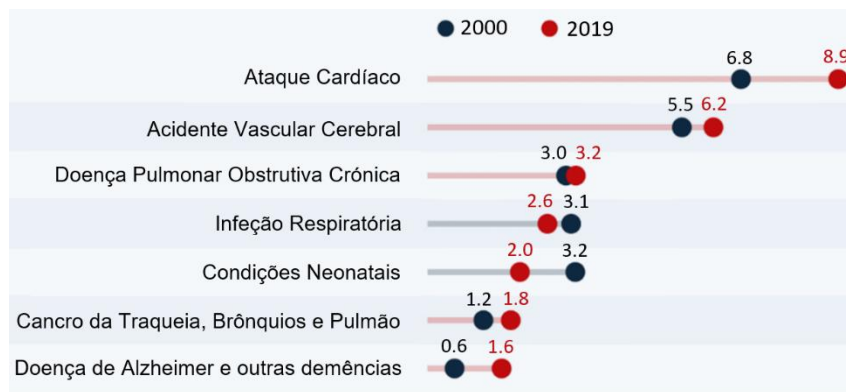


Figura 2 - Principais causas de morte em todo o mundo, em milhões de pessoas, extraído e adaptado de OMS [14].

1.2. O Papel do Colesterol

A hipercolesterolemia é um grupo de perturbações metabólicas do colesterol sendo caracterizada pelo elevado nível de colesterol plasmático [5].

Em contraste com outros lípidos caracterizados por longas cadeias alifáticas, o colesterol é um álcool insaturado da família dos esteróides, uma molécula policíclica de 27 carbonos, composta por 4 anéis fundidos numa conformação planar. Contém uma dupla ligação (C5-C6), uma substituição β -hidroxilo (C3) e uma simples cauda alifática de oito carbonos (Figura 3) [15,16].

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

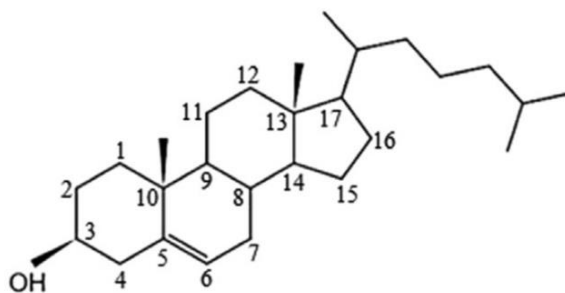


Figura 3 - Estrutura química do colesterol, extraído de Yuan *et al.* [17].

O colesterol é também uma molécula anfipática, no qual o carbono 3 está ligado a um grupo hidroxila, sendo este polar. No entanto, a restante molécula é não polar e hidrofóbica, como tal circula na corrente sanguínea associado em lipoproteínas [18]. As lipoproteínas são complexos de moléculas lipídicas e proteicas, designadas de apolipoproteínas, cuja função primária é o transporte, entre células alvo em muitos órgãos, e fornecimento de lípidos, como ácidos gordos, triglicéridos e colesterol, também encontrado sobre a forma de ésteres de colesterol, entre células alvo em muitos órgãos (Figura 4). As lipoproteínas diferem na percentagem de lípidos transportados e nas apolipoproteínas constituintes, transportando os lípidos para os locais apropriados onde ocorrerá o seu metabolismo através de interações com enzimas e recetores nas membranas celulares [18,19].

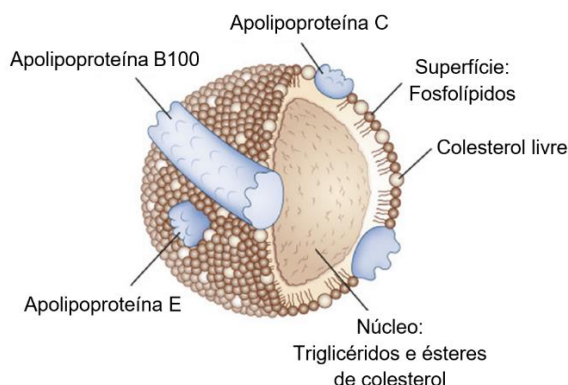


Figura 4 - Estrutura geral de uma lipoproteína, extraído e adaptado de Moini [19].

O colesterol desempenha um papel fundamental em muitos processos bioquímicos e biofísicos do organismo humano [17], sendo exemplo a sua contribuição para a manutenção da organização e estrutura das membranas celulares, promovendo a fluidez [20,21], mas também se associa de forma ordenada em locais específicos, nomeadamente, em jangadas de lípidos [22]. Esta distribuição e organização do colesterol nas membranas pode estar associada a funções celulares e influencia também a capacidade de algumas pequenas moléculas se difundirem através da membrana, o que acaba por alterar o ambiente interno da célula [23]. O colesterol também é o precursor de várias hormonas esteróides, ácidos biliares e vitamina D [24] e contribui para a manutenção das funções fisiológicas do cérebro [25].

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Apesar da sua importância para inúmeras funções fisiológicas, ao nível periférico, o colesterol, quando em excesso, é um fator de risco no que respeita às perturbações metabólicas e cardiovasculares, enquanto que ao nível do sistema nervoso central, a sua deficiência parece estar envolvida em várias doenças neurodegenerativas, tais como a doença de Alzheimer (AD) e o transtorno depressivo [25].

O metabolismo do colesterol está intimamente relacionado com o balanço entre a absorção do colesterol exógeno obtido pela dieta e a sua síntese endógena [17]. A sua homeostase depende de um equilíbrio complexo derivado da sua ingestão, absorção, síntese e excreção, mediada pelas lipoproteínas que o transportam e por proteínas mediadoras nas membranas celulares [5,25].

1.2.1. Metabolismo do Colesterol

O influxo de colesterol exógeno no organismo deve-se principalmente à ingestão de colesterol através da dieta. O colesterol exógeno é conjugado e solubilizado pelos ácidos biliares, absorvido pelo lado apical dos enterócitos, células epiteliais do intestino delgado [26], internalizado em partículas denominadas de quilomícrons e atinge a circulação sanguínea sistémica através da linfa. Durante este processo, os triglicéridos presentes nos quilomícrons são hidrolisados através de uma reação catalisada pela lipoproteína lípase (LPL), fornecendo ácidos gordos livres ao tecido muscular e adiposo. Os remanescentes de quilomícrons são internalizados no fígado, por endocitose mediada pelo recetor *Low density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP1) (Figura 5) [25,27]. O colesterol exógeno é encaminhado aos restantes tecidos em lipoproteínas de densidade muito baixa (partículas VLDL).

A biossíntese do colesterol endógeno começa no fígado com a formação das partículas VLDL. Os triglicéridos e os ésteres de colesterol associados a apolipoproteínas em partículas VLDL, são hidrolisados devido à ação da LPL, fornecendo ácidos gordos livres ao tecido muscular e adiposo, para serem depositados/armazenados e posteriormente usados como fonte de energia por oxidação no catabolismo celular. Consequentemente, numa primeira fase, as partículas VLDL são convertidas em partículas IDL (lipoproteína de densidade intermédia), de menor tamanho. De seguida, estas últimas são convertidas em partículas LDL (lipoproteína de densidade baixa), capazes de fornecer o colesterol necessário aos restantes tecidos periféricos (Figura 5) [28,29].

O excesso de colesterol nos tecidos é removido por uma via conhecida como transporte reverso do colesterol (RCT) que transporta o colesterol, ésteres de colesterol e fosfolípidos dos tecidos periféricos (extra-hepáticos) para o fígado [25,30]. O processo de RCT começa com a transferência de colesterol livre dos tecidos periféricos para as partículas HDL (lipoproteína de densidade elevada). De seguida, o colesterol é entregue ao fígado por uma via direta ou indireta para ser excretado. Na via direta, as partículas HDL ligam-se com elevada afinidade ao *scavenger receptor* classe B tipo 1 (SR-B1) no fígado e transferem o colesterol. Pela via indireta, as partículas de HDL são convertidas em partículas VLDL e LDL (Figura 5). Finalmente a última fase do RCT é a excreção do colesterol

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

hepático, que livre ou conjugado com ácidos biliares é secretado na biliar e eliminado através das fezes [30].

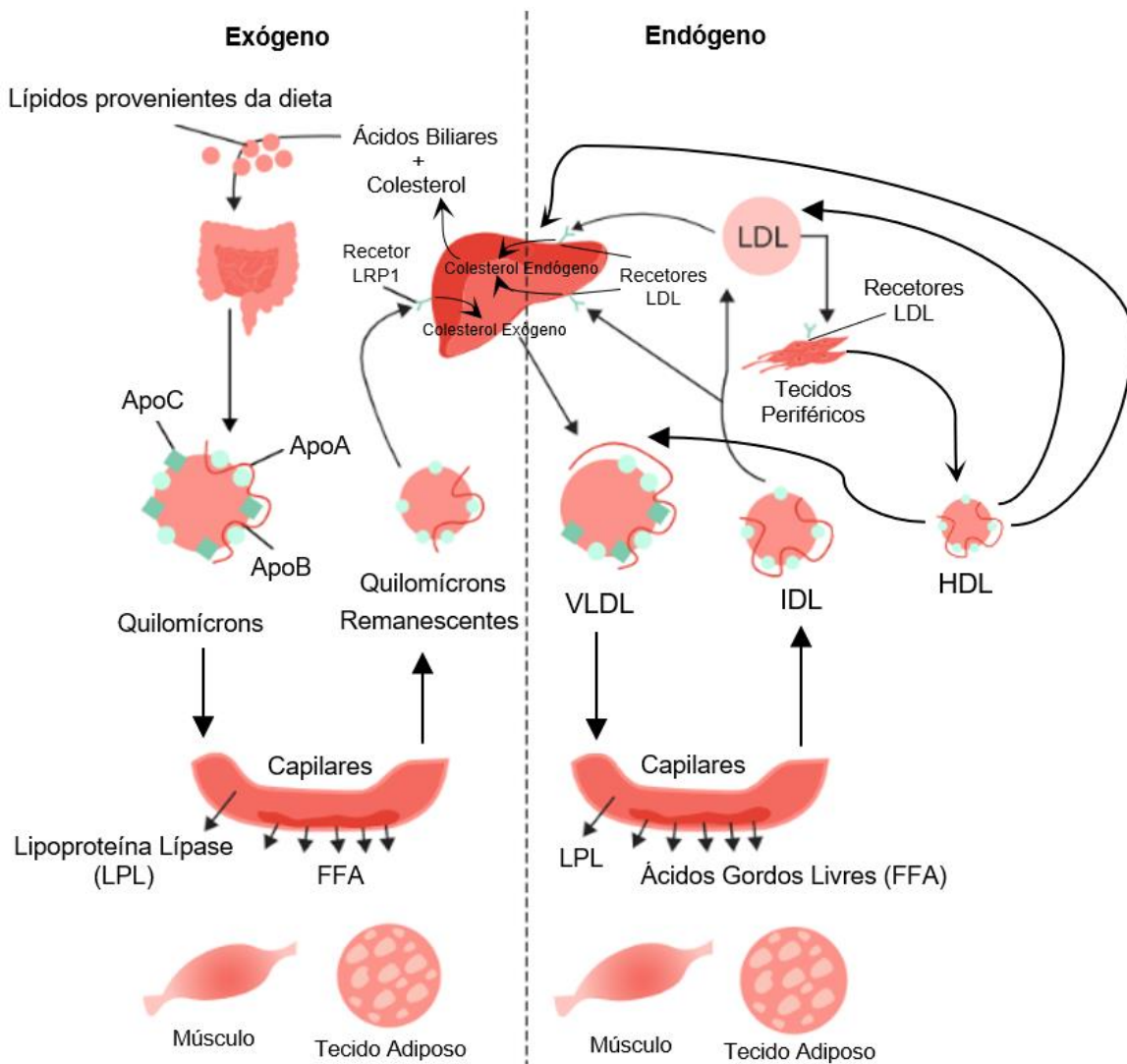


Figura 5 - Via endógena e exógena do metabolismo lipídico. Apo: apolipoproteína, extraído e adaptado de Karam *et al.* [31,32].

O fígado é o principal local para a manutenção da homeostase do colesterol, sendo que aqui também ocorre a biossíntese do colesterol endógeno com a participação de várias enzimas. A via biossintética começa com a condensação de três unidades de acetil-Coenzima A (acetil-CoA) para formar a 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA) (Figura 6). Posteriormente, ocorre a redução da HMG-CoA, mediada pelo fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH) e pela enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGR), para gerar o mevalonato. Esta é a etapa principal desta via biossintética e, conseqüentemente, a HMGR é um dos alvos terapêuticos da hipercolesterolemia. De seguida, o mevalonato é convertido em dois isoprenóides ativados, o isopentenil-pirofosfato e o dimetilalil-pirofosfato e ocorre a polimerização de seis unidades de isoprenóides em esqualeno. O esqualeno linear sofre uma série de reações de oxigenação e ciclização para formar o

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

lanosterol e, finalmente, o lanosterol é convertido em colesterol por desmetilações oxidativas sequenciais, isomerizações e reduções de dupla ligação catalisadas por diversas enzimas [15]. Posteriormente, a enzima acil-CoA colesterol aciltransferase 2 (ACAT2) esterifica o colesterol em ésteres de colesterol [17], sendo este transportado aos tecidos periféricos em partículas VLDL. A elevada concentração na corrente sanguínea de colesterol total, colesterol associado à lipoproteína LDL (LDL-C) ou triglicéridos e a baixa concentração de colesterol associado à lipoproteína HDL (HDL-C) são considerados biomarcadores de risco de CVDs [2].

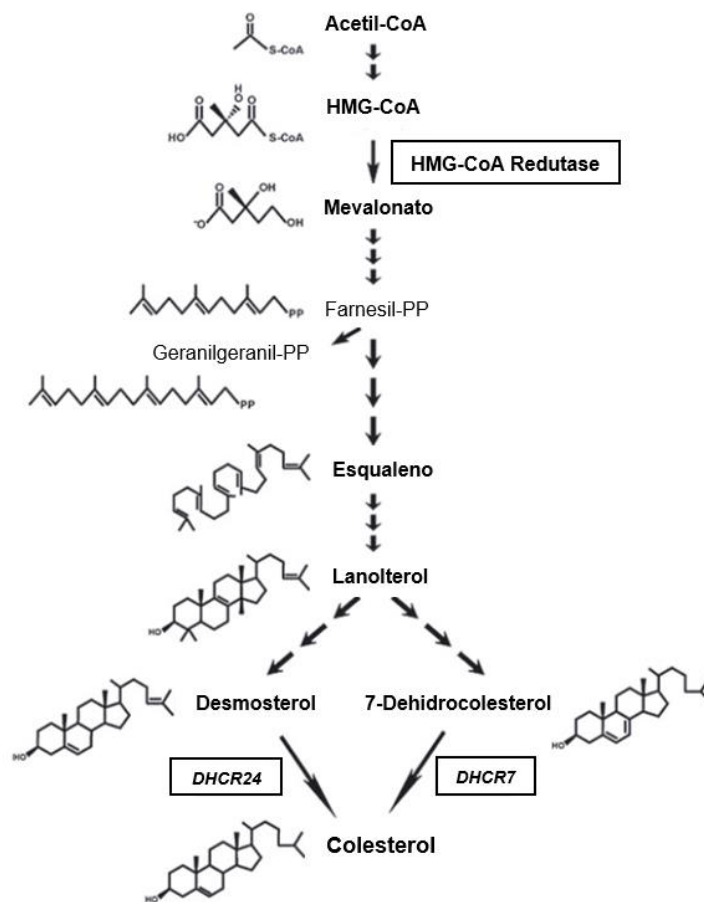


Figura 6 - Biossíntese do Colesterol, extraído e adaptado de Cortes *et al.* [15].

1.2.2. Proteínas Mediadoras da Circulação Entero-hepática do Colesterol

No lúmen intestinal, o colesterol livre exógeno proveniente da dieta é conjugado e solubilizado pelos ácidos biliares e fosfolípidos, dando origem a micelas (Figura 7). A proteína Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) está envolvida na absorção do colesterol livre destas micelas, na superfície apical do enterócito. O colesterol livre entra na circulação após ser esterificado pela enzima acil-CoA colesterol aciltransferase 2 (ACAT2) em ésteres de colesterol, que são internalizados em pré-quilomícrons no retículo endoplasmático pela proteína microsossomal de transferência (MTP). No sentido oposto, o colesterol livre presente no enterócito, pode ser também excretado para o lúmen intestinal pela ação

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

de outras proteínas transportadoras, as *ATP-binding cassettes* ABCG5/G8, sendo eliminado nas fezes.

Tal como referido anteriormente, os quilomícrons circulantes transferem a sua carga (colesterol livre e ésteres de colesterol) para o fígado. Também no hepatócito, o colesterol livre pode ser secretado pelos transportadores ABCG5/G8 ou internalizado pela NPC1L1 repetindo-se o processo de circulação do colesterol já referido (Figura 7). Assim, tanto no enterócito como no hepatócito, o efluxo de colesterol pelos transportadores ABCG5/G8 é oposto ao influxo de colesterol pela proteína NPC1L1 [33–35].

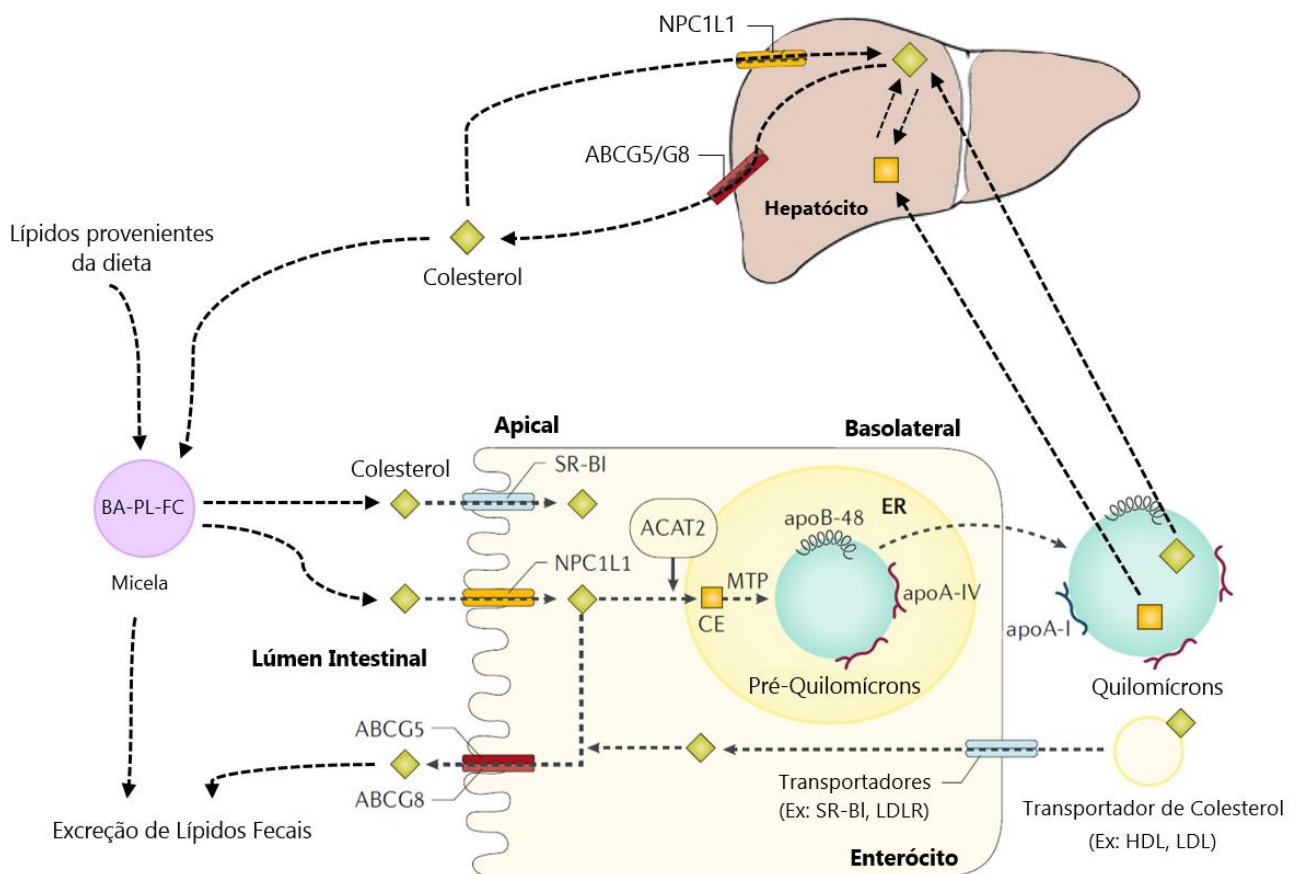


Figura 7 - Papel das proteínas transportadoras do colesterol NPC1L1 e ABCG5/G8 na circulação entero-hepática do colesterol. FC: colesterol livre; BA: ácidos biliares; PL: fosfolípidos; CE: ésteres de colesterol; LDLR: receptor da LDL; SR-B1: *scavenger receptor* classe B tipo 1, extraído e adaptado de Ko *et al.* [34,35].

1.2.3. Terapêutica na Redução do Nível de Colesterol

O incentivo à mudança de estilo de vida em conjunto com terapias medicamentosas são as estratégias mais eficazes na diminuição dos níveis de colesterol plasmático e, consequentemente, na redução do risco de CVDs. Os principais fármacos utilizados na redução dos níveis de colesterol plasmático são as estatinas e a ezetimiba [30,32].

As estatinas são o tratamento de escolha para a hipercolesterolemia, atuando por ligação ao centro ativo e inibindo a HMGR na biossíntese do colesterol no fígado [32, 33]. As estatinas podem

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

aumentar os níveis de HDL-C em 5-10%. Como tal, pode-se dizer que as estatinas promovem um RCT mais eficiente [30,38]. No entanto, as estatinas demonstraram ter efeitos secundários associados, tais como reações musculares esqueléticas adversas, que vão desde dores musculares a danos nas células musculares e, eventualmente, podem até mesmo provocar rabdomiólise severa [39], diabetes [40] e a possível formação de cataratas [41]. Um exemplo de estatinas é a pravastatina [30].

Por sua vez, a ezetimiba atua inibindo a proteína NPC1L1, impedindo seletivamente a absorção do colesterol da dieta quer nos enterócitos, nas células intestinais, quer nos hepatócitos [37,42]. A monoterapia com recurso à ezetimiba é recomendada em casos de hipercolesterolemia primária, em doentes em que a terapia com estatinas está contraindicada ou que não tolerem a terapia com estatinas [43]. No entanto, também a ezetimiba apresenta alguns efeitos secundários associados, tais como hepatotoxicidade [44] e dores musculares [45].

A terapia combinada da ezetimiba e estatinas, uma para reduzir a absorção de colesterol proveniente da dieta e outra para inibir a sua síntese, respetivamente [37], tem vindo a demonstrar elevada eficácia terapêutica, uma vez que permite a obtenção de uma maior redução do nível de LDL-C e triglicéridos [30].

No entanto, ambos os fármacos apresentam efeitos adversos que poderão tornar esta opção muito limitante. É importante, então, encontrar terapias alternativas em monoterapia ou em combinação que permitam reduzir o risco de CVDs. Tal facto pode ser conseguido com a integração de produtos naturais na alimentação ou de compostos seus derivados usados como suplementos alimentares, sendo exemplo disso as algas [30]. Foi visto que a permeação do colesterol pode ser afetada devido à competição de compostos bioativos presentes nas algas para transportadores de membrana como a proteína NPC1L1, em que os compostos bioativos presentes nas algas podem ligar-se ao transportador NPC1L1, impossibilitando a ligação do colesterol e a sua absorção pelos enterócitos [46].

1.3. Algas Marinhas

Vários produtos naturais, principalmente de origem vegetal e derivados de algas, têm sido referenciados por apresentarem potencial para o tratamento de várias doenças [47] tais como depressão [48], vitiligo [49], diabetes [50], CVDs [51], cancro [52–54] e foram reportadas por apresentarem atividades antioxidante e anti-inflamatória [55], frequentemente associadas à proteção contra várias patologias.

A procura por algas, seja para consumo humano ou para processamento de produtos comerciais, atingiu uma produção mundial de 15,8 milhões de toneladas em 2010, mas tem aumentado nos últimos anos [56].

As algas marinhas, também conhecidas como macroalgas, começaram por ser tradicionalmente consumidas como alimento em regiões do sudeste asiático, como a China, Japão e Coreia do

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Sul [57], e tornaram-se recentemente um dos alimentos mais populares em algumas das dietas ocidentais devido aos enunciados efeitos benéficos sobre a saúde, no aumento da esperança média de vida e prevenção de CVDs [58].

As algas marinhas são um extenso grupo de organismos autotróficos de estrutura simples com pouca ou nenhuma diferenciação celular e tecidos complexos, portanto são talófitos [57]. Estão distribuídas globalmente e podem ser encontradas em todas as zonas climáticas, desde as águas tropicais quentes até às regiões polares geladas. Atualmente, são conhecidas mais de 10000 espécies diferentes de algas marinhas [59].

As algas marinhas são classificadas taxonomicamente em três grupos, algas castanhas (filo *Ochrophyta*, classe *Phaeophyceae*), algas vermelhas (filo *Rhodophyta*) e algas verdes (filo *Chlorophyta*) (Figura 8) [59].

As cores destas estão associadas a pigmentos, como a fucoxantina para as algas castanhas, ficobilinas para as algas vermelhas e clorofila para as algas verdes [60].

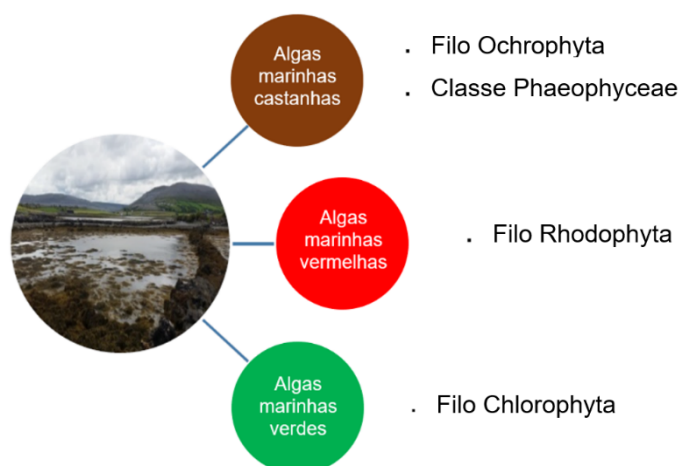


Figura 8 - Classificação taxonómica das algas marinhas com base na sua pigmentação, extraído e adaptado de Collins *et al.* [59].

As algas castanhas, também denominadas de *kelps*, variam do amarelo ao castanho escuro e estão divididas em dois subgrupos, *Laminariales* como a *Laminaria hyperborea*, *Laminaria ochroleuca* e *Eisenia bicyclis* (Aramé), que podem ter vários metros de altura e formar extensas florestas submarinas na costa Ocidental da Cantábria e na costa Atlântica da Península Ibérica. O outro subgrupo é denominado por *Fucales* como o *Fucus vesiculosus*, *Fucus serratus*, *Himanthalia elongata* e *Ascophyllum nodosum*, algas que formam faixas muito características no litoral [56] [59]. As algas vermelhas são as mais primitivas, tendo como espécies a *Porphyra/Pyropia* spp. (Nori), *Corallina officinalis*, *Tenarea tortuosa* e *Asparagopsis armata* [56]. As algas verdes apresentam uma pigmentação que varia do amarelo-esverdeado ao verde-escuro. A *Ulva lactuca*, também conhecida como alface do mar, é uma das mais conhecidas [56].

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

As algas marinhas estão consistentemente expostas tanto a pressões bióticas como abióticas nos seus ambientes marinhos naturais. Estas pressões exercem uma influência sobre a sua fisiologia, o que leva à produção de metabolitos, principalmente metabolitos secundários, nomeadamente compostos fenólicos, para que consigam sobreviver e prosperar. Atualmente, um número crescente de estudos têm demonstrado que alguns destes metabolitos podem atuar na saúde humana, como componentes bioativos, podendo ser potencialmente utilizados no desenvolvimento de novos ingredientes funcionais e tratamentos médicos [59].

Alguns dos metabolitos produzidos por algas marinhas demonstraram diversas propriedades terapêuticas, incluindo atividades antimicrobiana [61], antioxidante [62], anti-inflamatória [63], antidiabética [63], neuroprotetora [64], antiviral [65], fotoprotetora [66] e cardioprotetora em casos de hipoxia [67] (Figura 9). Também foi descrito que a ingestão de algas marinhas ou produtos derivados destas são uma possível estratégia na prevenção e tratamento de doenças, como osteoporose [68], doença renal crónica [69] e na prevenção de cancro [70].

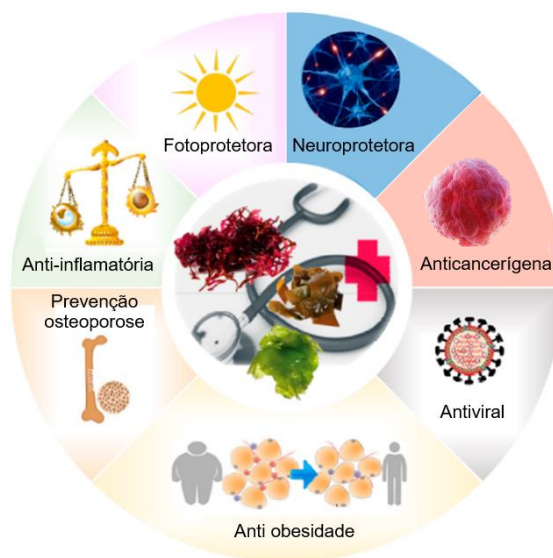


Figura 9 - Propriedades biológicas das algas marinhas já demonstradas em variados estudos, extraído e adaptado de Peñalver *et al.* [56].

1.3.1. *Eisenia bicyclis* (Aramé)

A *Eisenia bicyclis*, também conhecida como Aramé [71] é uma alga castanha perene, que pertence ao filo *Ochrophyta*, classe *Phaeophyceae*, ordem *Laminariales* [59], família *Laminariaceae* e encontra-se distribuída ao longo da costa do médio Pacífico da Coreia e do Japão [72]. É uma alga comestível frequentemente utilizada como acompanhamento de vários alimentos, sendo muitas vezes servida em pratos de peixe e marisco [73]. Foi demonstrada a presença de vários componentes bioativos na sua composição, tais como compostos fenólicos, nomeadamente, do grupo dos florotanninos, como os ecóis [74], polissacáridos, como a laminarina [75] e pigmentos carotenóides, como a fucoxantina [76].

1.3.2. *Porphyra tenera* (Nori)

O género *Porphyra*, tradicionalmente conhecido como “Nori” no Japão, “Kim” na Coreia e “Zicai” na China, é um alimento popular devido ao seu conteúdo rico em proteínas, vitaminas, minerais e fibras dietéticas. Pertence ao filo *Rhodophyta*, classe *Rhodophyceae*, ordem *Bangiales* e família *Bangiaceae* [77] e existem cerca de 133 espécies deste em todo o mundo [78]. As espécies de *Porphyra* são comestíveis e de fácil processamento [79]. As espécies mais comuns são a *Porphyra yezoensis*, *Porphyra tenera*, e *Porphyra haitanensis* [77]. O género *Porphyra tenera* é rico em compostos fenólicos, como os aminoácidos do tipo micosporina (MAAs) [80], carotenóides, como a fucoxantina [81] e polissacáridos, como o porfirano [82,83] e também é uma fonte de fibras alimentares, ácidos gordos essenciais, vitaminas e minerais [81].

1.3.3. *Fucus vesiculosus*

O *Fucus vesiculosus*, tradicionalmente conhecido como “bladderwrack” [84] é uma alga marinha castanha comestível, que pertence ao filo *Ochrophyta*, classe *Phaeophyceae* [85], ordem *Fucales* [86] e família *Fucaceae* [87]. É amplamente disseminado e dominante nos fundos rochosos das zonas costeiras do Mar Báltico [88]. Esta alga tem como constituintes principais o iodo [84], pigmentos carotenóides, como a fucoxantina [89], fibras dietéticas e polissacáridos [84], como o fucoídano. Também contém proteínas, minerais, vitaminas, ácidos gordos e compostos fenólicos do grupo dos florotaninos, nomeadamente, os fucofloroetóis [74].

1.4. Compostos e Atividades das Algas Marinhas

A procura por novos compostos bioativos baseados em produtos naturais tem impulsionado o estudo e interesse relativamente às algas marinhas, nomeadamente, o estudo das propriedades benéficas associadas aos seus polissacáridos, compostos fenólicos e proteínas.

1.4.1. Polissacáridos

As algas castanhas apresentam diferentes polissacáridos na sua constituição, nomeadamente, a laminaria (*Eisenia bicyclis*) e fucoídano (*Fucus vesiculosus*). Por outro lado, as algas vermelhas apresentam como polissacáridos o porfirano (*Porphyra tenera*) [75].

A laminaria pertence à categoria de pequenos glucanos e é um polissacárido com 20-25 unidades de β -(1 \rightarrow 3)-glucano com ligações glicosídicas β -(1 \rightarrow 6) (Figura 10) [30]. A laminaria presente

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

nas algas foi considerada associada a diferentes atividades, incluindo de anti-apoptose [90], antioxidante [91], anticancerígena [92], anti-inflamatória [93] e de regulação da microbiota intestinal [94].

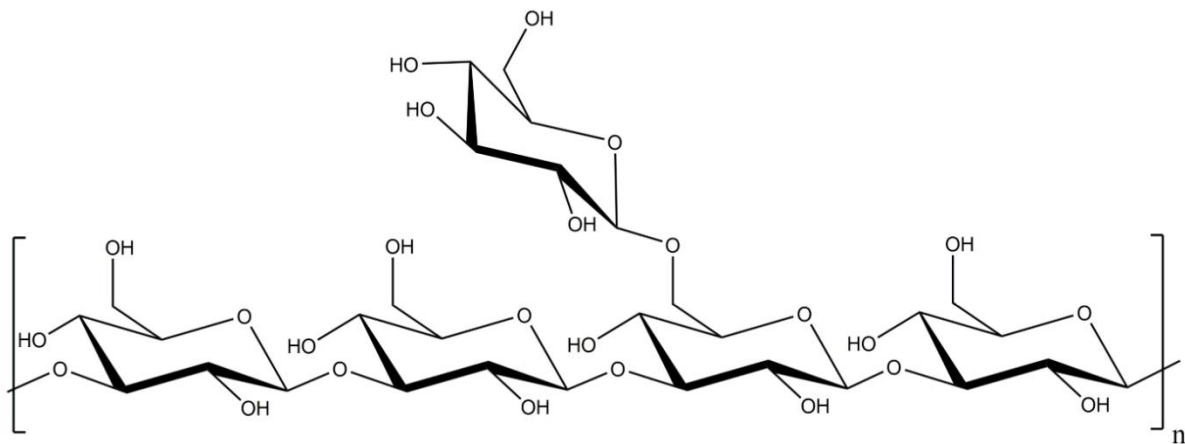


Figura 10 - Estrutura da laminaria, extraído e adaptado de Ozanne *et al.* [95].

Os fucanos são polissacáridos sulfatados, sendo o mais estudado o fucoidano [96]. O fucoidano pode apresentar dois tipos de estrutura, com ligações (1→3)- α -L-fucose ou com ligações alternadas (1→3)- α -L-fucose e (1→4)- α -L-fucose, apresentando também grupos sulfato, geralmente substituídos nas posições C-2, C-3 e C-4 [97,98] (Figura 11). O fucoidano presente em algas foi descrito como apresentando diversas atividades, tais como antibacteriana [86], anticancerígena [99], antiviral [100] e antitrombótica [101]. O fucoidano demonstrou reduzir os níveis de colesterol total, triglicéridos e LDL-C e aumentar o nível de HDL-C [102].

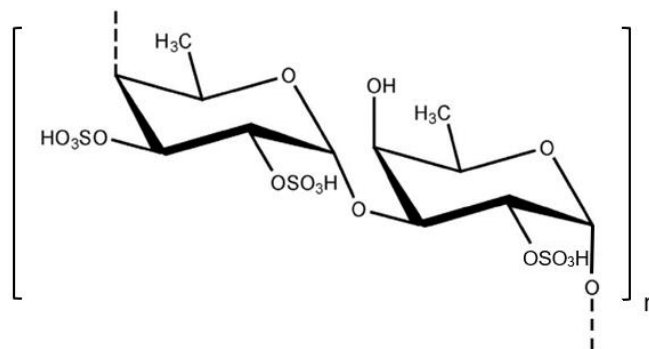


Figura 11 - Estrutura do fucoidano, extraído e adaptado de Ahmed *et al.* [103].

O porfirano tem uma estrutura genérica semelhante à da agarose, onde a unidade A pode ser formada por 3 ligações β -D-galactose alternadas por ligações 6-O-metil- β -D-galactose, enquanto que a unidade B pode apresentar 4 ligações α -L-galactose-6-sulfato ou 3,6-anidro α -L-galactose (Figura 12) [77,82,104]. O porfirano presente em algas tem sido usado como fibra alimentar e sido reportado como apresentando diversas atividades biológicas associadas, como atividades anticancerígena [105], antioxidante [104], antiviral [104] e anti-inflamatória [106].

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

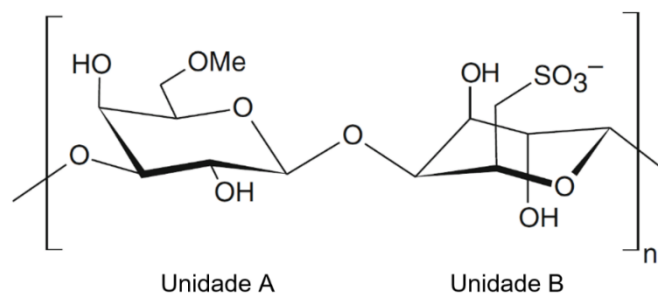


Figura 12 - Estrutura do porfirano, extraído e adaptado de Pierre *et al.* [107].

1.4.2. Compostos Fenólicos

As algas castanhas apresentam diferentes compostos fenólicos na sua constituição, nomeadamente, florotaninos, bromofenóis, flavonóides e terpenóides fenólicos. Por outro lado, as algas vermelhas apresentam como compostos fenólicos, os MAAs, bromofenóis, flavonóides e terpenóides fenólicos [108].

Os florotaninos são compostos polifenólicos frequentemente descritos nas algas castanhas, constituídos por unidades polimerizadas de floroglucinol (1,3,5-tri-hidroxibenzeno) (Figura 13) [109]. Os florotaninos são classificados em 6 grandes grupos, dependendo do tipo de ligação que existe entre as unidades de floroglucinol e grupos hidroxilo, em fucóis, floretois, fucofloretois, fualóis, carmalóis e ecóis. Alguns destes estão representados na Figura 14, como o ecol da *Eisenia bicyclis* e o fucol e fucofloretol do *Fucus vesiculosus* [74,109].

Os florotaninos identificados na alga *Fucus vesiculosus* foram referidos como apresentando atividades antioxidante [110], anti-inflamatória [110], anticancerígena [111] e com capacidade de prevenção e ou tratamento de várias doenças, tais como diabetes [112] e obesidade [112]. Os florotaninos desta alga foram ainda descritos como potenciais inibidores de enzimas, como a acetilcolinesterase (AChE), associada a doenças neurodegenerativas, e a HMGR, associada à hipercolesterolemia e, adicionalmente capaz de reduzir a permeação intestinal do colesterol exógeno [46].

Os florotaninos identificados na alga *Eisenia bicyclis* apresentaram atividades anticancerígena [113], antibacteriana [114], antiviral [115] e anti-inflamatória [76]. Estes compostos são referidos como potenciais agentes hepatoprotetores [116] e pelo facto de também poderem ser utilizados no tratamento de doenças, designadamente neurodegenerativas [72] e de hiperpigmentação, podendo ser assim utilizados na indústria cosmética [113].

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

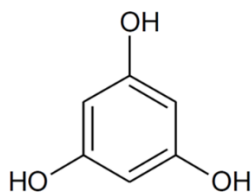


Figura 13 - Estrutura química do floroglucinol, extraído de Erpel *et al.* [109].

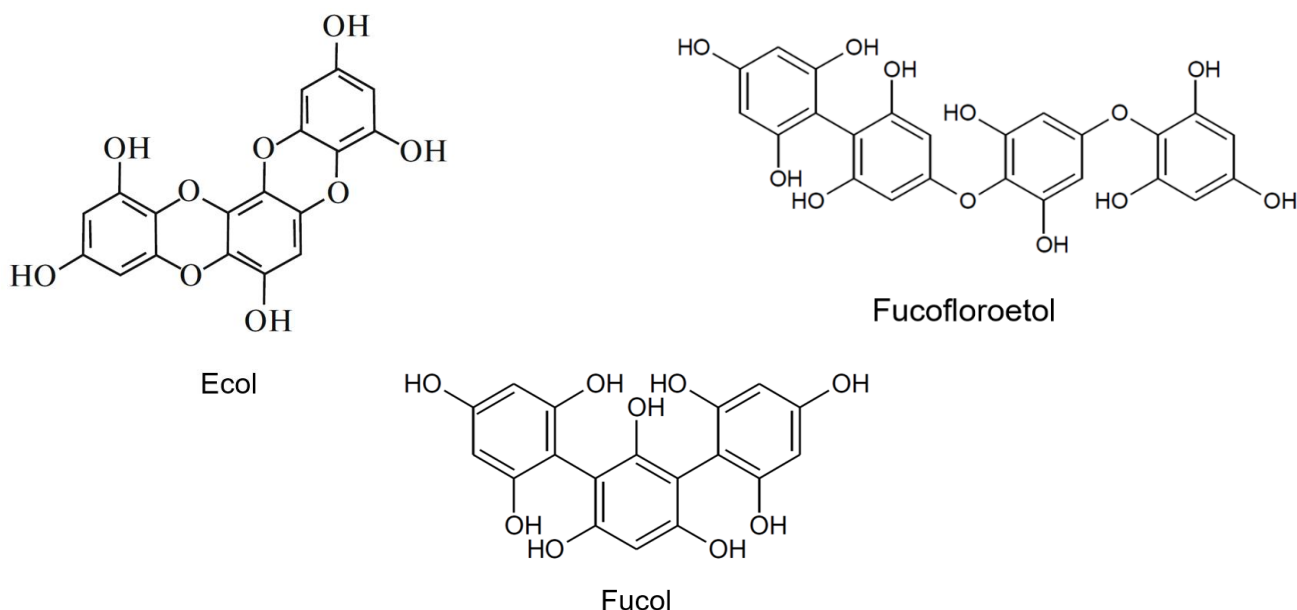


Figura 14 - Estrutura química do ecol, fucofloroetol e fucol, extraído e adaptado de Junge *et al.* e Erpel *et al.* [72,109].

As algas vermelhas são referidas como apresentando uma baixa concentração de compostos fenólicos, quando comparadas com as algas castanhas, nomeadamente florotaninos [117]. No entanto, as algas vermelhas, especialmente a espécie *Porphyra*, são referidas como apresentando uma elevada concentração e diversidade de MAAs [117–119]. Os MAAs são reportados como apresentando atividades antioxidante [120] e anti-inflamatória [121], e como são osmoprotetores [122] e fotoestáveis, são comercializados como protetores solares naturais para substituir ou complementar os protetores solares de base sintética existentes [123]. Os MAAs são ainda considerados com potencial terapêutico na redução de processos de envelhecimento da pele [121] e têm uma potencial aplicação na medicina regenerativa na reprogramação celular [124].

1.4.3. Proteínas

As algas marinhas são consideradas como uma fonte viável de proteínas e, algumas espécies contêm níveis de proteína semelhantes aos das fontes proteicas tradicionais, tais como a carne, ovos, soja e leite [125,126]. O conteúdo proteico das algas castanhas é geralmente baixo (3-15 % do seu peso seco), mas nas algas vermelhas é bastante elevado (até 47% do seu peso seco)

[30,56,127]. A maioria das algas apresenta como proteínas maioritárias, as ficobiliproteínas e lectinas. [30,56,128].

As ficobiliproteínas presentes em algas são reportadas como apresentando atividades antioxidante [129], anticancerígena [130] e promissoras propriedades de anti-envelhecimento [129]. Quanto às lectinas estão associadas a atividades anti-inflamatória [131], antibacteriana [132], antiviral [133], anti-hiperglicémica [134], antioxidante [134] e anticancerígena [135].

1.5. Compostos antioxidantes e atividade antioxidante

Dos compostos bioativos descritos nas algas marinhas, uma grande maioria é descrita como sendo antioxidantes naturais que têm a capacidade de retardar ou até mesmo prevenir os danos oxidativos causados por espécies reativas [136].

As espécies reativas mais comuns são as espécies reativas de oxigénio (ROS) e as espécies reativas de azoto (RNS). Destas espécies reativas também fazem parte radicais livres que são átomos ou moléculas instáveis devido à presença de eletrões desemparelhados [137]. Exemplos de espécies reativas são o radical hidroxilo (OH^\cdot), superóxido (O_2^\cdot), hidroperoxil (OOH^\cdot), peroxil (ROO^\cdot), peróxido de hidrogénio (H_2O_2), trióxido de diazoto (N_2O_3) e peroxinitrito (ONOO^\cdot) [137,138].

As espécies reativas são produzidas endogenamente a partir da atividade metabólica do corpo humano ou obtidas exogenamente por contacto com poluentes atmosféricos, radiação, ozono e químicos industriais [136]. A acumulação excessiva de ROS/RNS pode provocar a oxidação de componentes celulares, incluindo lípidos, proteínas e ácido desoxirribonucleico, levando a um comprometimento da função e, eventualmente, à morte celular [137].

A quantidade excessiva de espécies reativas encontra-se também associada a inúmeras doenças, nomeadamente a cancro, AD, Parkinson [139] e diabetes [140], devido à indução de stress oxidativo, ou seja, ao desequilíbrio entre os oxidantes e antioxidantes a favor dos oxidantes [141].

A redução de espécies reativas é um dos mecanismos de defesa dos antioxidantes contra os radicais livres [137,141]. Estas espécies podem ser eliminadas por compostos antioxidantes endógenos ou exógenos ou mecanismos celulares enzimáticos antioxidantes [142]. Nas últimas décadas, o mercado de antioxidantes tem tido um aumento exponencial. Estes compostos têm elevada procura industrialmente, por exemplo como conservantes na indústria alimentar e em aplicações na cosmética e saúde, para fortalecer as defesas antioxidantes evitando doenças.

1.6. Compostos Bioativos para a Inibição da Acetilcolinesterase

As CVDs encontram-se associadas a um risco acrescido no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, sendo um dos fatores de risco a hipoxia, em que existe a redução do fluxo sanguíneo, o que conseqüentemente perturba o fornecimento adequado de oxigénio ao cérebro, provocando danos nas células neuronais [143,144]. A AD é uma doença neurodegenerativa

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

irreversível, progressiva e multifatorial, associada à deterioração da memória, que dificulta a vida quotidiana da pessoa afetada, levando, em última análise, a perturbações comportamentais [145,146].

O desenvolvimento e progressão da AD encontra-se associada a vários fatores, tais como à indução do stress oxidativo e à hipótese colinérgica [146]. De acordo com a hipótese colinérgica, a típica desaceleração dos processos de aprendizagem e memória são maioritariamente causados por uma diminuição dos níveis neuronais de acetilcolina (ACh), levando a uma perda da transmissão colinérgica a nível pré-sináptico. A acetilcolina é sintetizada a partir da colina e acetil-coA, pela enzima colina acetiltransferase, no citosol do neurónio colinérgico pré-sináptico e é armazenada em vesículas sinápticas, que posteriormente sofrem exocitose. Após ser libertada na fenda sináptica, a ACh liga-se rapidamente aos recetores colinérgicos no neurónio pós-sináptico. A estimulação destes recetores termina rapidamente com a ação da acetilcolinesterase (AChE), uma enzima localizada na fenda sináptica. A AChE catalisa a hidrólise da ACh em acetato e colina. A recaptação da colina para o neurónio pré-sináptico é realizada pelos transportadores de colina, e todo o ciclo da transdução de sinal na junção neuromuscular é terminada em apenas alguns milissegundos (Figura 15) [146,147].

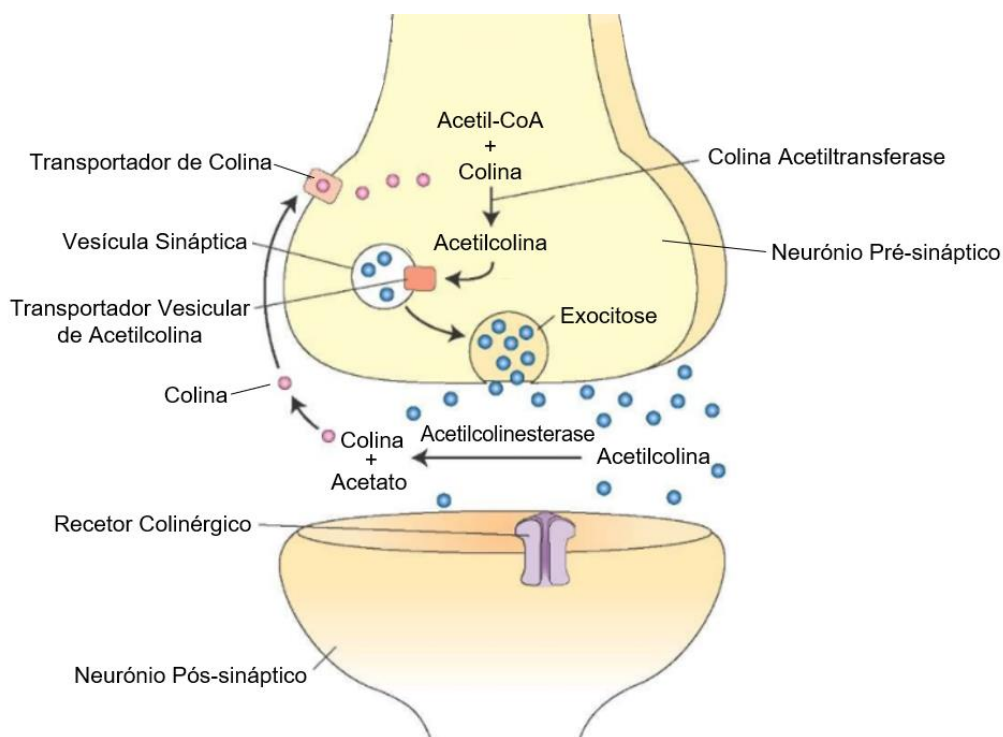


Figura 15 - Transmissão do impulso nervoso nos neurónios e o papel da acetilcolinesterase, extraído e adaptado de Vecchio *et al.* [146,148].

A inibição da AChE é um dos tratamentos da AD, como tal esta é o alvo de abordagens terapêuticas, de acordo com a hipótese colinérgica [146]. No entanto, os fármacos que existem atualmente no mercado, tais como a rivastigmina, donepezil e galantamina, apresentam diversos efeitos secundários associados, tais como náuseas, vómitos, diarreia, perda de peso, anorexia e

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

diminuição do apetite, efeitos cardíacos adversos, perturbações do sono, dores de cabeça, tonturas e dores abdominais [149,150]. Torna-se assim, fundamental a procura por alternativas na prevenção e diminuição da progressão de doenças neurodegenerativas. Os compostos presentes nas algas poderão ser uma possibilidade, pois alguns dos polissacáridos e compostos fenólicos de algas demonstraram ter atividade neuroprotetora [72,151] o que pode ser associado à capacidade que alguns destes compostos demonstram na inibição da enzima AChE [46].

1.7. A Nanotecnologia como Estratégia para Melhorar a Atividade Biológica de Compostos Bioativos

A nanotecnologia, através do desenvolvimento de nanopartículas (NPs), tem vindo a revolucionar a administração de fármacos, uma vez que a sua encapsulação melhora significativamente o perfil de libertação, absorção e segurança destes fármacos [152–157]. Dado o seu reduzido tamanho e elevada área superficial, as NPs apresentam uma grande capacidade de interação e reatividade, elevada biodisponibilidade [158] e, ao serem usadas como veículos, permitem a proteção dos fármacos de enzimas presentes no sistema digestivo, proteção relativamente ao pH ácido do estômago e têm a capacidade de atravessar membranas e barreiras, como o revestimento intestinal [159]. Para além de melhorar a solubilidade e estabilidade dos fármacos, as NPs podem vetorizar o fármaco para um tecido ou órgão específico [160]. Além disso, as NPs promovem uma libertação sustentada com a possibilidade da administração de uma dose reduzida [160–163].

As NPs são definidas como sistemas de veículos, que podem ou não ser biodegradáveis e que apresentam um diâmetro compreendido entre os 10-1000 nm [164–166]. O termo NP é uma designação coletiva tanto para nanoesferas como para nanocápsulas. As nanoesferas apresentam uma estrutura matricial, em que os fármacos podem ser absorvidos na superfície da esfera ou encapsulados dentro da partícula. As nanocápsulas são sistemas vesiculares, nos quais o fármaco se encontra confinado a uma cavidade constituída por um núcleo líquido interno rodeado por uma membrana polimérica. Neste caso, os fármacos são normalmente dissolvidos no núcleo interno, mas também podem ser adsorvidos à superfície da cápsula [167] (Figura 16).

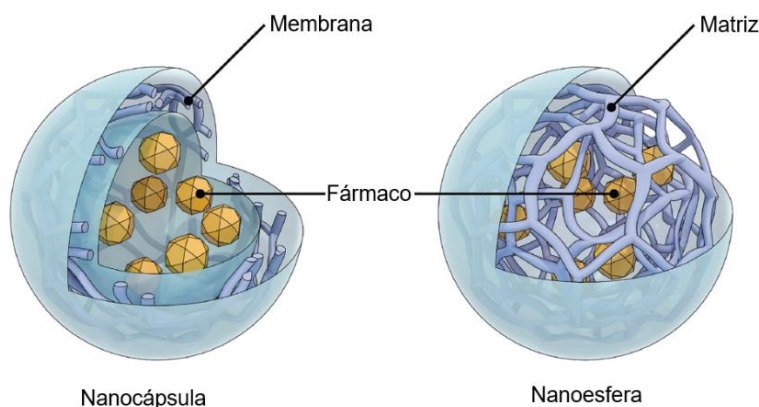


Figura 16 - Estrutura de uma nanoesfera e nanocápsula, extraído e adaptado de Suffredini *et al.* [168].

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

As NPs podem conter um ou mais compostos bioativos e podem apresentar várias formas (Figura 17), o que permite a sua utilização em diversas áreas tais como o fabrico de dispositivos, eletrónica, ótica e células de biocombustíveis [169] e podem ser preparadas a partir de macromoléculas inorgânicas ou orgânicas que podem ser de vários tipos, tais como à base de lípidos, polímeros/ proteínas, metálicas, de carbono e híbridas (Figura 18) [170].



Figura 17 - Formas adotadas pelas NPs, extraído e adaptado de Hamida *et al.* [169].

No que respeita às NPs inorgânicas, as mais estudadas são as NPs metálicas, tais como as NPs de ouro e prata, que apresentam propriedades óticas e eletrónicas únicas, o que as torna particularmente úteis, por exemplo na imagiologia biomédica. No entanto, devido ao seu núcleo sólido, a funcionalização de fármacos consiste na ligação de superfície, o que expõe os fármacos conjugados tanto à degradação como às dinâmicas de troca na corrente sanguínea e a sua utilização em terapias também poderá ser limitada pela sua baixa biodegradabilidade. Da mesma forma, as NPs inorgânicas à base de sílica apresentam uma estrutura porosa capaz de proteger os fármacos no seu interior, mas o seu perfil de segurança no que respeita a ensaios *in vivo* ainda necessita de ser caracterizado. Por outro lado, as NPs orgânicas apresentam uma biocompatibilidade e biodegradabilidade melhorada, sendo por isso mais adequadas para aplicações terapêuticas. As NPs de base lipídica podem apresentar uma monocamada lipídica, como é o caso das micelas, ou uma bicamada lipídica, como nos lipossomas. Esta subclasse é a mais utilizada em estudos pré-clínicos e clínicos devido à sua biocompatibilidade, sendo que também têm a capacidade de vetorizar uma vasta gama de moléculas com propriedades físico-químicas distintas. Contudo, são referidos alguns limites relacionados com a sua estabilidade a longo prazo [170].

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

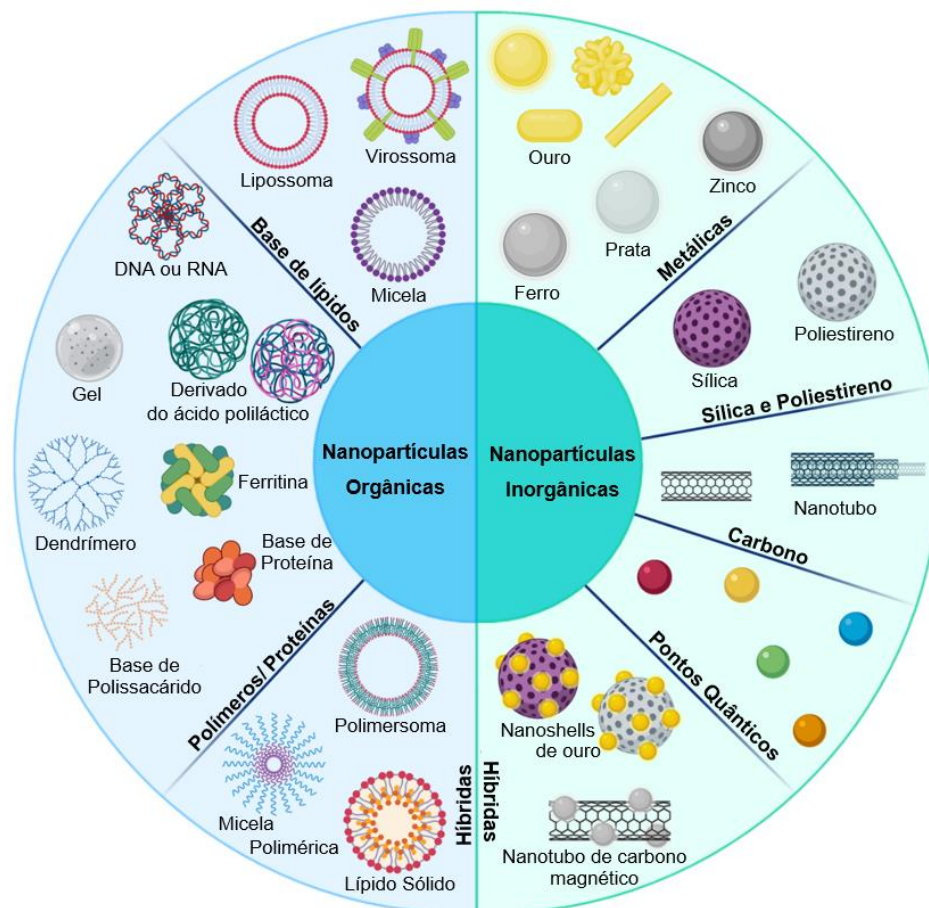


Figura 18 - NPs orgânicas e inorgânicas na entrega de fármacos, extraído e adaptado de Briolay *et al.* [170].

Relativamente às NPs à base de polímeros/proteínas, estas apresentam várias vantagens, como a não antigenicidade. São altamente biodegradáveis, não tóxicas e oferecem a possibilidade de fácil modificação da superfície. São fáceis de preparar e de monitorizar o tamanho e apresentam a capacidade de se ligar covalentemente a fármacos e/ou ligandos [171,172]. Da grande variedade de proteínas geralmente utilizadas para preparar NPs, a albumina tem sido amplamente selecionada, pois é a proteína mais abundante no plasma sanguíneo, sendo biocompatível e biodegradável [163,172]. Além disso, esta exibe um alvo ativo e atividade específica no sistema fígado-pâncreas [173]. Também apresenta uma elevada solubilidade em água e elevado tempo de meia-vida no sistema sanguíneo (19 dias) [152]. Todas estas vantagens tornam-na um material perfeito para a preparação de NPs. Além disso, a presença de múltiplos locais de ligação na sua estrutura permite a sua ligação a várias moléculas ativas [174].

As NPs de albumina podem ser usadas na encapsulação de fármacos como forma de melhorar a sua solubilidade ou evitar degradação e efeitos adversos, sendo exemplo disso a encapsulação do fármaco milrinona no tratamento de CVDs [161] e da sinvastatina na inibição da HMGR [162]. No entanto, as NPs de albumina também foram usadas para encapsular outros compostos bioativos como forma de aumentar a sua solubilidade, exemplo disso é a encapsulação da crisina, um composto fenólico presente em várias plantas usado na terapia antitumoral [175], a quercetina, um

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

composto fenólico presente em vegetais e frutas com reconhecida atividade antioxidante [176], a curcumina, um composto fenólico presente no açafrão que pode impedir a progressão de doenças neurodegenerativas [177] e o carvacrol, um lípido presente em plantas aromáticas como o tomilho com reconhecidas atividades anti-inflamatória e antibacteriana e utilizado no tratamento de artrite reumatóide [178].

As albuminas mais estudadas são a albumina de soro humano, albumina de soro bovino (BSA) e ovalbumina [174]. As partículas de BSA são geralmente pequenas e permitem a libertação de fármacos de uma forma controlada [179]. Estudos demonstraram que algumas NPs de BSA podem ser usadas no tratamento de doenças neurodegenerativas [180], acidentes vasculares cerebrais [181], tuberculose [182] e na terapia de diabetes do tipo 1 e do tipo 2 [183].

A formulação de NPs contendo compostos bioativos provenientes de algas ainda é uma temática bastante inexplorada, mas que tem vindo a ganhar uma atenção generalizada por ser uma síntese segura, simples, sustentável e rentável [184]. Algumas das aplicações já investigadas são a biorremediação e atividades antibacteriana [185], antifúngica [186] e anticancerígena [187].

Também é importante salientar que a maioria dos estudos referenciados na bibliografia efetuados com NPs são *in vitro*, como tal a realização de estudos *in vivo* torna-se de grande relevância, principalmente para NPs sistemas de veículos de fármacos ou compostos bioativos. Tendo em conta, tanto a fisiologia como o metabolismo, os ratos Wistar, frequentemente usados para avaliar tanto a hipercolesterolemia como possíveis patologias associadas [188], foram utilizados como modelo animal para os estudos efetuados. O estudo do efeito da administração nos ratos das formulações de NPs desenvolvidas foi complementado com uma análise metabolómica, em que foi avaliado o impacto da toma das formulações no perfil dos metabolitos do seu soro.

2. Objetivos

Este trabalho teve como principal objetivo desenvolver uma formulação de nanopartículas (NPs) de albumina de soro bovino (BSA) com compostos bioativos naturais provenientes da alga Aramé, como alternativa aos fármacos disponíveis no mercado que apresentam diversos efeitos secundários, na redução do risco de doenças cardiovasculares (CVDs), nomeadamente na prevenção da hipercolesterolemia, o principal fator de risco associado a estas doenças.

Com esse intuito, numa primeira fase do trabalho, efetuou-se a preparação e caracterização de compostos bioativos presentes nas algas marinhas *Eisenia bicyclis* (Aramé), *Porphyra tenera* (Nori) e *Fucus vesiculosus* (Fucus), sendo que para tal realizou-se a quantificação dos fenóis totais, proteínas e polissacáridos e avaliou-se a citotoxicidade recorrendo às linhas celulares HepG2 do carcinoma hepatocelular e Caco-2 do adenocarcinoma colorretal. Simultaneamente compararam-se as três algas em termos das suas potenciais atividades biológicas. Para tal determinou-se a atividade antioxidante, foi avaliada a inibição da acetilcolinesterase (AChE), no que respeita ao potencial relativamente a doenças neurodegenerativas, e foi avaliada a inibição da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A redutase (HMGR) e redução da permeação do colesterol num modelo da barreira gastrointestinal, na prevenção da hipercolesterolemia. O objetivo desta primeira etapa era selecionar o extrato de alga que demonstrasse maior potencial contra a hipercolesterolemia, para a sua posterior encapsulação em NPs.

Numa segunda fase do trabalho, realizou-se para o extrato com melhores resultados, o extrato da alga Aramé, a encapsulação em NPs de BSA. Nesta fase, o objetivo foi comparar as atividades biológicas e efeito *in vitro* na hipercolesterolemia das NPs de BSA contendo os compostos do extrato encapsulados (NPs Aramé) relativamente ao extrato de Aramé livre. Ensaios *in vivo* com ratos Wistar e posterior análise metabólica do soro destes permitiram complementar o estudo com o objetivo de avaliar a ação no seu metabolismo no que diz respeito ao consumo de extrato de Aramé e NPs Aramé. O objetivo final foi melhorar as propriedades do extrato de Aramé e facilitar a administração e absorção deste com a sua encapsulação em NPs de BSA, bem como obter para o extrato encapsulado um maior potencial contra a hipercolesterolemia e consequente redução do risco de CVDs.

3. Materiais e Métodos

3.1. Reagentes

O meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), o meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640), a L-glutamina e a tripsina 10x foram comprados à Lonza (Basileia, Suíça). O antimicótico, o floroglucinol, o reagente Folin-Ciocalteu, o acetato de sódio, o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), o colesterol, o acetilcolinesterase (AChE), o iodeto de acetilcolina (AChI) e a albumina de soro bovino (BSA) foram obtidos da Sigma-Aldrich (Barcelona, Espanha). O ácido sulfúrico concentrado e o tris-(hidroximetil)-aminometano (Tris) foram adquiridos à Merck kGaA (Darmstadt, Alemanha). O ácido trifluoroacético (TFA) e o cloreto de sódio foram comprados à PanReac (Barcelona, Espanha). O metanol absoluto, o ácido cítrico, o cloreto de magnésio hexahidratado ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$) e o etanol foram obtidos da Honeywell (Charlotte, EUA). O metanol 96 % foi comprado à LabChem (Zelienople, EUA). O soro de bovino fetal foi obtido da Biowest (Nuaille, França). O tampão fosfato salino (PBS) foi adquirido à Corning (Nova York, EUA). O ácido poligalacturónico, o 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico) (DTNB), o acetonitrilo Optima LC/MS, o ácido fórmico 99,5 % Optima LC/MS grade, o isopropanol LC/MS Optima grade, o ácido acético glacial (HPLC) e o hidróxido de sódio certified AR foram comprados à Thermo Fisher Scientific (Waltham, EUA). O fenol e o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) foram obtidos a partir da VWR (Radnor, EUA). O acetonitrilo (ACN) foi adquirido à CARLO ERBA (Cornaredo, Itália). O hidróxido de sódio foi comprado à Scharlau (Barcelona, Espanha). A ezetimiba foi obtida do grupo Azevedos (Amadora, Portugal) e purificada por solubilização em metanol comprado na LabChem (Zelienople, EUA). O isoflurano foi obtido a partir da IsoVet, B Braun (Melsungen, Alemanha).

3.2. Obtenção dos Extratos e Determinação do Rendimento de Produção

As algas marinhas Aramé e Nori foram compradas numa superfície comercial, sendo a Aramé da marca Seara (Lote T20220405, Validade 04.2022) e a Nori da linha Blue Dragon da marca Flavors - International Flavours Shop® (Lote JS2039J01, Validade 07.2021). Enquanto que a alga Fucus foi recolhida durante a maré baixa no estuário do rio Tejo (Lisboa, 38.7822N, -9.0913W).

Como a alga Fucus foi recolhida no rio Tejo teve de ter uma lavagem e pré-tratamento. Numa primeira fase foi colocada em água com uma pequena quantidade de lixívia e de seguida foi lavada com água corrente. Este processo foi repetido três vezes e entre cada uma das lavagens escolheram-se as algas em melhores condições. Posteriormente, foram cortadas em pequenos fragmentos e secas no liofilizador Heto® PowerDry LL3000 (Thermo Fisher Scientific, Milford, EUA).

De acordo com a disponibilidade de biomassa, prepararam-se os extratos de Aramé, Nori e Fucus com água destilada (33 g/L, 20 g/L e 10 g/L, respetivamente). Estas soluções foram colocadas em frascos de vidro e sujeitas ao autoclave Uniclave 99 [A.J. Costa (Irmãos), Agualva-Cacém,

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Portugal] a 121 °C por 15 min. Após o arrefecimento a 4 °C realizou-se a filtração com gaze e papel de filtro Whatman nº 1 e, de seguida, estas foram congeladas a -20 °C e liofilizadas.

Para o cálculo do rendimento dos extratos usou-se a Equação (1).

$$\eta = \frac{\text{Massa seca obtida}}{\text{Massa inicial}} \times 100 \quad (1)$$

Para a obtenção das frações purificadas dos extratos realizou-se uma Extração em Fase Sólida (SPE). Foram preparadas soluções dos extratos de Aramé, Nori e Fucus em água Milli-Q (30 mg/mL, 15 mg/mL e 11,77 mg/mL, respetivamente). As colunas Sep-Pak C18 Plus Short Cartridge (360 mg por coluna, tamanho da partícula 55-105 µm) (Waters, Milford, EUA) foram inicialmente lavadas com metanol e de seguida com água. Posteriormente adicionou-se 1 mL de extrato à coluna e recolheu-se uma fração inicial de 3 mL de água e de seguida uma fração com 5 mL de metanol. Repetiu-se o processo utilizando as mesmas colunas até usar todo o volume de extrato. De seguida, as frações purificadas metanol (M) e água (A) foram secas utilizando ar comprimido à temperatura ambiente, congeladas a -20 °C e, por fim, liofilizadas. Para o cálculo do rendimento das frações purificadas utilizou-se, mais uma vez, a Equação (1).

3.3. Caracterização dos Extratos e Amostras por HPLC-DAD

A análise dos extratos das frações purificadas das algas e nanopartículas (NPs) em estudo foi efetuada por HPLC-DAD Elite LaChrom® VWR HITACHI (Tóquio, Japão) equipado com Pump L-2130, Autosampler L-2200, Column Oven L-2300 e Diode Array Detector L-2455 (VWR, EUA) e com a coluna LiChroCART® RP-18, 100 Å, 250 x 4 mm, 5 µm (Merck), usando um gradiente de acetonitrilo (ACN) e água (0,05 % TFA, v/v) (Tabela 1) e um fluxo de 0,8 mL/min. Em cada corrida foi injetado 25 µL de solução de amostra preparada em água Milli-Q, a deteção foi feita entre os 200 e os 600 nm. Cada corrida teve a duração de 55 min.

Os cromatogramas obtidos para os extratos e frações purificadas das algas foi para o máximo de intensidade de absorvência entre os 250-600 nm e foram representados até aos 35 min, intervalo onde foram observados picos. Os cromatogramas obtidos para os extratos das algas referentes ao comprimento de onda de 266 nm, para a deteção do floroglucinol, foram representados até aos 25 min, utilizando a Figura Anexo 1 na seleção do comprimento de onda.

Os cromatogramas referentes à determinação da eficiência de encapsulação (EE) das NPs foram representados entre os 13-17 min considerando a intensidade máxima de entre 250-600 nm. No ensaio de permeação na barreira gastrointestinal, a quantificação dos compostos bioativos presentes nas amostras foi efetuada entre os 7-8 min, considerando a intensidade máxima de absorvência entre 250-600 nm.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Tabela 1 - Método utilizado na obtenção dos cromatogramas dos extratos e frações purificadas das algas e das NPs em estudo.

Tempo (min)	% ACN	% Água com 0,05% de TFA
0	0	100
30	30	70
40	80	20
45	80	20
50	30	70
52	0	100
55	0	100

Para a análise por HPLC-DAD das amostras obtidas no ensaio de permeação do colesterol na barreira gastrointestinal usou-se uma coluna LiChroCART® RP-8, 100 Å, 250 x 4 mm, 5 µm (Merck) com uma fase móvel constituída por um sistema binário de ACN e metanol, em modo isocrático (50:50, 0-15 min) e um fluxo de 1 mL/min. Em cada corrida foi injetado 75 µL de amostra, a deteção foi feita entre os 200 e os 400 nm e a corrida teve a duração de 15 min. A quantificação do colesterol foi efetuada entre os 5-6 min e considerou-se a altura máxima da intensidade de absorvência para o comprimento de onda de 210 nm.

3.4. Quantificação dos Fenóis Totais

O método *Folin-Ciocalteu* caracteriza-se por ser um método simples e sensível utilizado na determinação do conteúdo fenólico em produtos naturais mas não é específico [189,190]. Neste método, os polifenóis disponíveis em extratos de plantas reagem com um complexo redox específico, o reagente Folin-Ciocalteu, constituído por uma mistura de heteropoliácidos, nos quais o molibdénio e o tungsténio estão no estado de oxidação 6+ [189]. O mecanismo básico consiste numa reação de oxidação/redução, em que o grupo fenólico é oxidado e o ião metálico, molibdénio, reduzido (Mo^{6+} a Mo^{5+}) [190]. A reação forma um cromóforo azul que pode ser quantificado por espectrofotometria de luz visível [189]. A intensidade da cor azul é proporcional à quantidade de compostos fenólicos reativos presentes na amostra (Figura 19) [191]. A reação em geral fornece dados precisos, mas não específicos, no que respeita à possível presença de compostos fenólicos na amostra, pois vários grupos de compostos fenólicos têm a capacidade de alterar a cor do reagente de *Folin-Ciocalteu* de amarelo para azul [189].

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

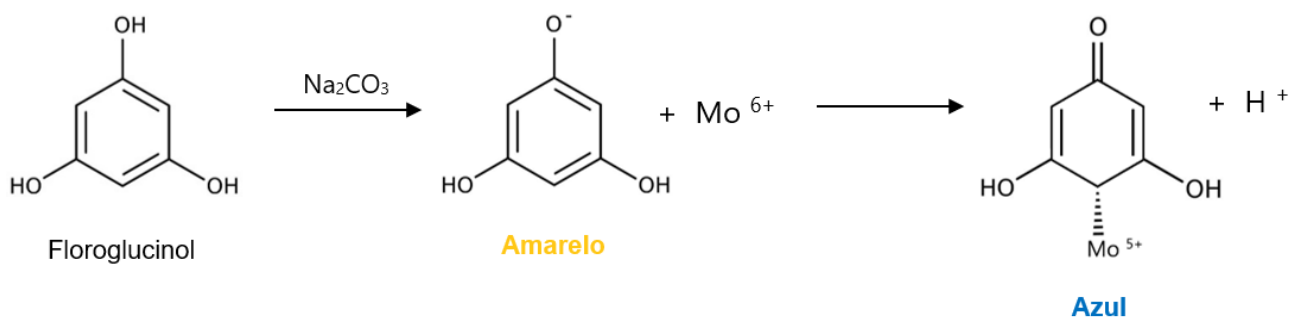


Figura 19 - Mecanismo reacional da redução do reagente *Folin-Ciocalteu* através da oxidação de compostos fenólicos presentes na amostra em estudo, extraído e adaptado de Ford *et al.* [192].

Para a quantificação dos fenóis totais dos extratos e frações de Aramé, Nori e Fucus realizou-se o método de *Folin-Ciocalteu* descrito por Oktay *et al.* [193]; a reta de calibração foi determinada usando um padrão de floroglucinol com concentração de 0 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, seguindo o protocolo descrito anteriormente por Parys *et al.* [194]. Para a realização da reta de calibração usaram-se 30 μL da solução padrão (0-5 mg/mL) para cada uma das concentrações, à qual foi adicionada 1350 μL de água destilada e 30 μL do reagente *Folin-Ciocalteu*. Esta solução foi agitada no vortex Heidolph® REAX 2000 (Schwabach, Alemanha) por 3 min. Finalmente, passados 3 min, adicionaram-se 90 μL de uma solução de Na_2CO_3 a 2 % (m/v). Posteriormente incubou-se esta mistura durante 1 hora sob agitação orbital Stuart® Rotator SB2 (Ashford, Reino Unido) a 4 °C. Por fim, a absorvância desta mistura foi avaliada a 760 nm com o auxílio do espectrofotômetro Shimadzu® UV-160A (Quioto, Japão). Para os ensaios foram usados 90 μL da amostra. Para a quantificação de fenóis totais nos extratos e frações, os ensaios foram realizados com 90 μL de soluções destes preparadas em água Milli-Q na vez da solução padrão e 1290 μL de água destilada.

Recorreu-se à Equação (2) obtida a partir da reta de calibração do floroglucinol (Figura Anexo 2). Sendo que $\text{Abs}_{760\text{nm}}$ representa a absorvância a 760 nm e $C_{\text{Floroglucinol}}$ é a concentração de floroglucinol por mL de solução. A quantidade de fenóis totais nos extratos e frações foi calculada em equivalentes de floroglucinol (PGE) por mg de massa seca (mg PGE/mg).

$$\text{Abs}_{760\text{nm}} = 6,125 C_{\text{Floroglucinol}} + 0,0207 \quad (2)$$

Os ensaios foram realizados em triplicado.

3.5. Quantificação das Proteínas Totais

O 2-D Quant Kit foi concebido para a determinação precisa da concentração de proteínas presentes numa dada amostra. O procedimento utiliza a combinação de um precipitante e co-precipitante disponibilizado no kit para precipitar quantitativamente a proteína da amostra, deixando em solução os contaminantes interferentes. A proteína é precipitada por centrifugação e ressuspendida

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

numa solução alcalina de íons cúpricos. Os íons cúpricos ligam-se à cadeia principal do polipéptido de qualquer proteína presente. De seguida é adicionado um agente colorimétrico que reage com os íons cúpricos que não se ligaram. A densidade da cor obtida encontra-se inversamente relacionada com a concentração de proteína na amostra e a concentração de proteína pode ser estimada com precisão por comparação com uma curva padrão com albumina do soro bovino (BSA). Uma vez que o ensaio não depende da reação com grupos laterais de proteínas, a reatividade é independente da composição de aminoácidos. Neste ensaio existe pouca variação de proteína para proteína [195].

Para a quantificação de proteínas totais dos extratos e frações de Aramé, Nori e Fucus foi utilizado o 2-D Quant Kit de acordo com o procedimento descrito pela GE Healthcare [195].

Para o cálculo da concentração de proteínas presentes na solução de extratos e frações, usou-se a reta de calibração da absorvância a 480 nm em função da quantidade de BSA (Q_{BSA}) em (mg proteína/mg amostra) (Figura Anexo 3), através da Equação (3).

$$Abs_{480nm} = -0,0067 Q_{BSA} + 0,857 \quad (3)$$

Os ensaios foram realizados em triplicado.

3.6. Quantificação dos Polissacáridos Totais

O método do fenol-ácido sulfúrico é um método colorimétrico simples, rápido, fiável e muito utilizado na determinação do conteúdo de polissacáridos totais [196,197]. O mecanismo consiste numa reação dos sacáridos com o fenol sob condições ácidas fortes, resultando num complexo colorido, que pode ser medido a 490 nm (Figura 20) [196]. A reação não é específica, pois diferentes grupos de sacáridos podem dar origem a um mesmo produto laranja, e as respostas são ligeiramente diferentes para diferentes unidades de sacáridos, uma vez que os complexos de açúcar-fenol absorvem a luz, a 490 nm, de uma forma diferente [196].

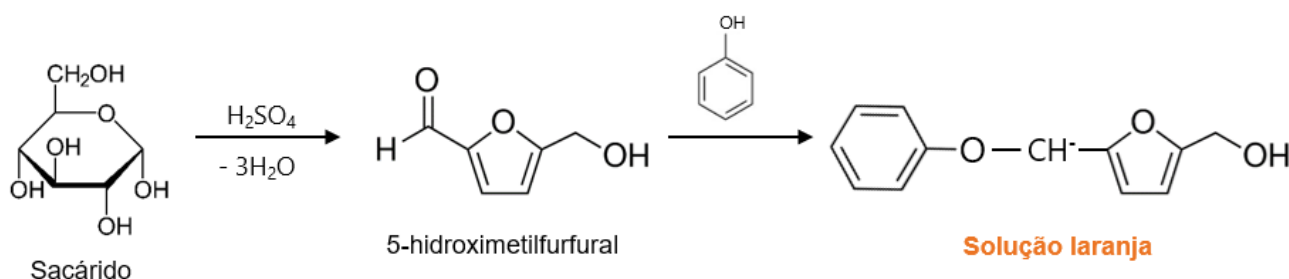


Figura 20 - Esquema reacional do método ácido-fenol sulfúrico na determinação dos polissacáridos totais presentes na amostra em estudo, extraído e adaptado de Viel *et al.* [198].

Para a quantificação de polissacáridos totais dos extratos e frações de Aramé, Nori e Fucus foi utilizado o método do fenol-ácido sulfúrico referido anteriormente mas em microplaca, previamente

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

descrito por Masuko *et al.* [199]. Para a construção da reta de calibração foi utilizado o intervalo de concentrações de 0 e 10 µg/ µL da solução padrão de ácido poligalacturónico a 1 % (m/v) em tampão citrato 0,05 M e pH 4,5 (Farmacopeia Portuguesa 9). Prepararam-se soluções de extrato e frações em água Milli-Q.

Para os ensaios foram preparadas misturas contendo 50 µL da solução padrão ou amostra a analisar, 150 µL de ácido sulfúrico concentrado e, por fim, 30 µL de uma solução aquosa de fenol a 5 % (m/v). Incubou-se esta mistura num banho termostaticado Lauda® Ecoline Staredition RE140 (Lauda-Königshofen, Alemanha) a 90 °C durante 5 min. Após arrefecimento, procedeu-se à leitura da absorvância a 490 nm num leitor de microplacas TECAN® Sunrise (Männedorf, Suíça). O ensaio em branco foi realizado com água Milli-Q.

Para o cálculo da concentração de polissacáridos totais presentes nos extratos e frações em (mg de equivalentes de ácido poligalacturónico (PE)/mg massa seca), usou-se a reta de calibração da absorvância a 490 nm em função da concentração de ácido poligalacturónico ($C_{\text{Ácido Poligalacturónico}}$) (Figura Anexo 4), através da Equação (4).

$$\text{Abs}_{490\text{nm}} = 9514,9 C_{\text{Ácido Poligalacturónico}} + 600,66 \quad (4)$$

Os ensaios foram realizados em triplicado.

3.7. Ensaio de Segurança *in vitro*

De modo a avaliar a segurança dos extratos, das frações das algas e das nanopartículas (NPs) em estudo, foi analisado o seu potencial citotóxico em linhas celulares humanas. O ensaio colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é um método bem caracterizado, simples, fácil de realizar e comumente aplicado para a determinação da viabilidade celular e citotoxicidade [200,201]. O ensaio é baseado na redução do MTT (cor amarela) a formazan (cor púrpura), que é facilmente dissolvido em solventes orgânicos (Figura 21).

As células viáveis e o crescimento rápido apresentam elevadas taxas de redução do MTT, enquanto que as células mortas ou inativas não o fazem. O ensaio baseia-se na quantificação do formazan a 540 nm que é diretamente associado à atividade enzimática e indiretamente associado ao número de células viáveis. A elevada intensidade da cor púrpura sugere uma maior viabilidade celular, enquanto que a menor intensidade desta significa que existe um número reduzido de células e, portanto, a citotoxicidade da amostra em análise [200].

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

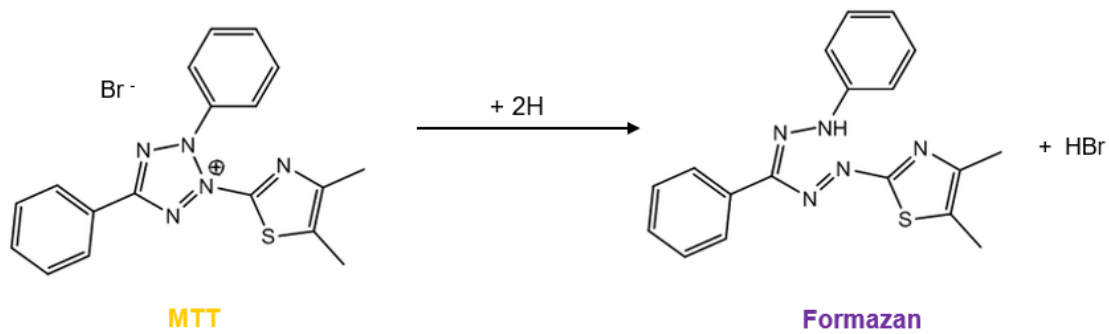


Figura 21 - Reação de redução do MTT a formazan, extraído e adaptado de Grela *et al.* [202].

Para este ensaio foram utilizadas duas linhas celulares humanas: a linha celular HepG2 do carcinoma hepatocelular (ECACC 85011430) e a linha celular Caco-2 do adenocarcinoma colorretal (ECACC 86010202). As células cresceram em frascos T75 com meio DMEM e RPMI, respetivamente, suplementado com 10 % e 20% de soro de bovino fetal (FBS), respetivamente e com 5 mL de antimicótico e 5 mL de L-glutamina, numa estufa Sanyo® O₂/ CO₂ Incubator (Hampton, EUA) a 37 °C, com atmosfera de 5 % de CO₂. O meio foi trocado a cada 48/72 horas, até se atingir uma confluência de, aproximadamente, 80 %. Atingida a confluência, retirou-se o meio e lavaram-se as células com PBS (Farmacopeia Portuguesa 9). Seguidamente adicionaram-se 1-2 mL de tripsina (10x) e incubou-se na estufa, durante 5-10 min, de modo a ressuspender as células. Com o auxílio de uma micropipeta multicanal adicionou-se 100 µL de uma suspensão de células contendo 5 x 10⁴ células/mL a todos os 96 poços da microplaca e incubou-se na estufa até se atingir a confluência. Posteriormente, o meio foi removido e colocaram-se 100 µL das soluções das amostras a testar com diferentes concentrações (0,5 e 1 mg/mL) dissolvidos em meio RPMI (para as células Caco-2) e DMEM (para as células HepG2). Foram preparados ensaios controlo apenas com meio de cultura. A microplaca foi incubada durante 24 horas e posteriormente, retirou-se novamente o meio, procedeu-se à lavagem com PBS e adicionou-se uma solução de MTT (0,5 mg/mL) dissolvido em meio de cultura. De seguida, a microplaca foi incubada durante 4 horas. Para finalizar este processo retirou-se o reagente MTT e adicionou-se 200 µL de metanol a cada um dos poços, como forma a dissolver os cristais de formazan formados. A absorvância foi lida a 595 nm, com referência a 630 nm, num leitor de microplacas TECAN® Sunrise (Männedorf, Suíça). A percentagem de viabilidade celular para as amostras analisadas foi determinada através da Equação (5).

$$\text{Viabilidade Celular (\%)} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{Amostra}}}{\text{Abs}_{\text{Controlo}}} \right) \times 100 \quad (5)$$

Onde Abs_{Amostra} é a absorvância das amostras testadas e Abs_{Controlo} é a absorvância do controlo.

Os ensaios foram realizados em triplicado.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

$$AA (\%) = \frac{Abs_{517 \text{ nm Controlo}} - Abs_{517 \text{ nm Amostra}}}{Abs_{517 \text{ nm Controlo}}} \times 100 \quad (6)$$

Onde $Abs_{517 \text{ nm Controlo}}$ é a absorvância a 517 nm do controlo e $Abs_{517 \text{ nm Amostra}}$ é a absorvância a 517 nm das amostras.

Após a determinação das atividades antioxidantes, foi calculado o EC_{50} para o extrato de Aramé, que corresponde à concentração de solução que apresenta uma atividade antioxidante de 50 %.

Os ensaios foram realizados em triplicado.

3.9. Inibição da AChE

Uma das técnicas mais utilizadas para avaliar a atividade da acetilcolinesterase (AChE) é a reação de Ellman devido à sua sensibilidade e simplicidade [208]. Neste método, a acetiltiocolina é utilizada como substrato, a enzima AChE hidrolisa-a em acetato e tiocolina e este último composto é complexado com o reagente de Ellman [DTNB, 5,5'-ditio-bis(2-ácido nitrobenzóico)] para formar um dissulfureto misto e o ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) de cor amarela (Figura 23). Esta mudança de cor, devido ao TNB, pode ser monitorizada por métodos espectrofotométricos a 405 nm [208,209].

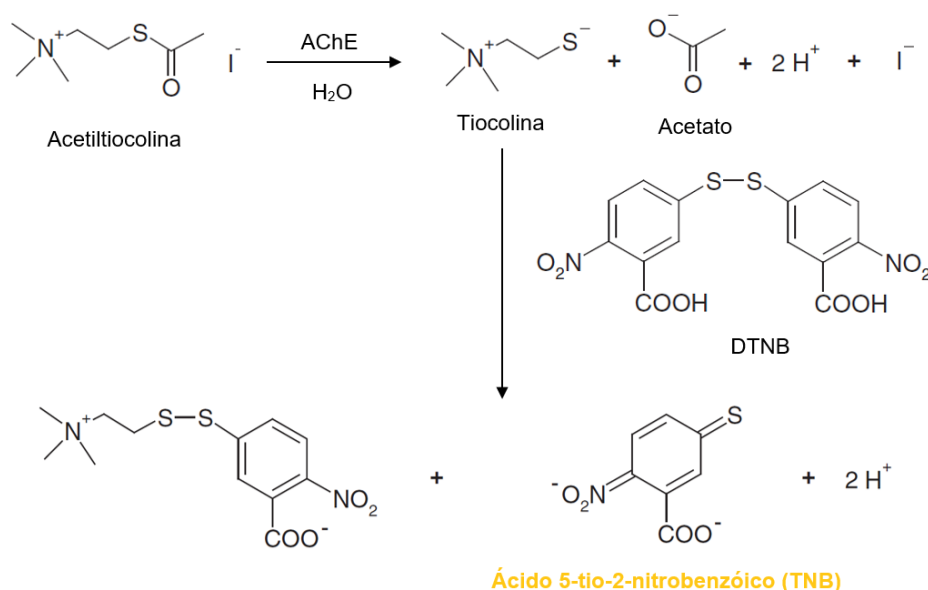


Figura 23 - Mecanismo reacional do ensaio de Ellman para a determinação da atividade da AChE, extraído e adaptado de Worek *et al.* [210].

Como forma de estudar a inibição da enzima AChE usou-se o método descrito por Falé *et al.* [207]. Numa primeira fase determinou-se a atividade 100 % da enzima AChE referente ao controlo sem inibição, garantindo que a atividade inicial da enzima era, aproximadamente, de 0,1 UA/min. Para tal, adicionou-se 325 μL de tampão Tris 50 mM a pH 8, 100 μL de água e 25 μL de AChE (0,1 U/mL), agitou-se e incubou-se à temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, adicionaram-

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

-se 75 µL da solução de iodeto de acetilcolina (AChI) (0,33 mg/mL em água) e 475 µL da solução de DTNB (1,2 mg/mL em tampão Tris 50 mM a pH 8 com 0,05 M NaCl e 0,02 M MgCl₂·6H₂O). Agitou-se a mistura e leu-se a absorvância a 405 nm durante 3 min no espectrofotómetro Shimadzu® UV-160A (Quioto, Japão). Contra um ensaio em branco sem enzima. Prepararam-se as soluções de extrato, frações e NPs em água Milli-Q.

De seguida, realizou-se a avaliação da percentagem de inibição da AChE realizando o mesmo processo na presença da solução em estudo. Adicionaram-se 325 µL de tampão Tris 50 mM a pH 8, 100 µL da solução de amostra a testar e 25 µL de AChE, agitou-se e incubou-se à temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, adicionaram-se 75 µL da solução de AChI e 475 µL da solução de DTNB. Agitou-se e leu-se a absorvância a 405 nm durante 3 min no espectrofotómetro Shimadzu® UV-160A (Quioto, Japão) contra um ensaio em branco sem enzima.

A percentagem de inibição da AChE foi determinada através da Equação (7).

$$\text{Inibição AChE (\%)} = 100 - \frac{V_r \text{ Amostra}}{V_r \text{ Atividade 100 \%}} \times 100 \quad (7)$$

Onde $V_r \text{ Amostra}$ é a velocidade da reação para a amostra em estudo e $V_r \text{ Atividade 100 \%}$ é a velocidade da reação para a atividade de 100 % da enzima AChE.

Os ensaios foram realizados em triplicado.

3.10. Inibição da HMGR

A 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA redutase (HMGR) catalisa a reação de redução da HMG-CoA em coenzima A e mevalonato (Figura 24). Este ensaio é baseado numa medição espectrofotométrica da diminuição da absorção, que representa a oxidação do NADPH pela subunidade catalítica da enzima HMGR na presença do substrato HMG-CoA [211].

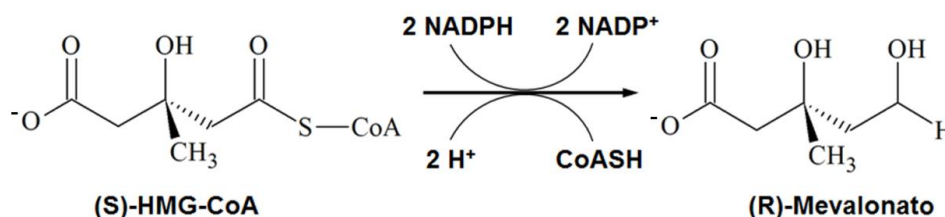


Figura 24 - Reação catalisada pela HMG-CoA redutase, extraído e adaptado de Son *et al.* [212].

Para a determinação da atividade da HMGR foi utilizado um kit comercial (Sigma-Aldrich; Barcelona, Espanha) [211]. Numa primeira fase, determinou-se a velocidade da reação da enzima HMGR, que corresponde a 100% de atividade. Para tal adicionaram-se 865 µL de tampão 1x disponibilizado no kit, 50 µL de água, 20 µL de NADPH (17 mg/mL de NADPH em tampão), 60 µL de

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

HMG-CoA e 5 µL de HMGR e agitou-se. Posteriormente, a absorvância foi lida a 340 nm durante 5 min com o espectrofotômetro Shimadzu® UV-160A (Quioto, Japão) usando como controlo uma mistura igual sem enzima. De seguida, realizou-se o mesmo procedimento para o inibidor presente no kit, a pravastatina. Prepararam-se soluções de extrato, frações e NPs em água Milli-Q. Para avaliar o potencial de inibição da HMGR pelos extratos e NPs preparadas, os ensaios enzimáticos realizaram-se do mesmo modo na presença de 50 µL de uma solução aquosa do extrato a analisar.

A percentagem de inibição da HMGR foi determinada através da Equação (8).

$$\text{Inibição HMGR (\%)} = 100 - \frac{V_{r \text{ Amostra}}}{V_{r \text{ Atividade 100 \%}}} \times 100 \quad (8)$$

Onde $V_{r \text{ Amostra}}$ é a velocidade da reação para a amostra em estudo e $V_{r \text{ Atividade 100 \%}}$ é a velocidade da reação para a atividade de 100 % da enzima HMGR.

Os ensaios foram realizados em triplicado.

3.11. Ensaios de Permeação na Barreira Gastrointestinal

Quando cultivada durante 23 dias, a linha celular Caco-2 do adenocarcinoma colorretal diferencia-se num estado funcional e morfológicamente semelhante aos enterócitos humanos. Em culturas tridimensionais, a monocamada celular cultivada em *inserts* forma uma barreira que simula o epitélio intestinal. Aqui, o lado apical mimetiza o lúmen intestinal e o lado basolateral representa a corrente sanguínea (Figura 25) [213].

Recorrendo a este modelo celular pode monitorizar-se a absorção gastrointestinal de substância(s) de interesse, como o colesterol e outros compostos. Neste caso é simulada a sua ingestão, por inclusão da(s) substância(s), de início a partir do lado apical (simulando o lúmen intestinal) de células Caco-2 diferenciadas (simulando enterócitos) e depois verificando-se a sua permeação para o lado basolateral (simulando a saída para a corrente sanguínea). A deteção da(s) substância(s) permite determinar a percentagem de permeação da(s) mesma(s) durante o tempo da experiência [213].

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

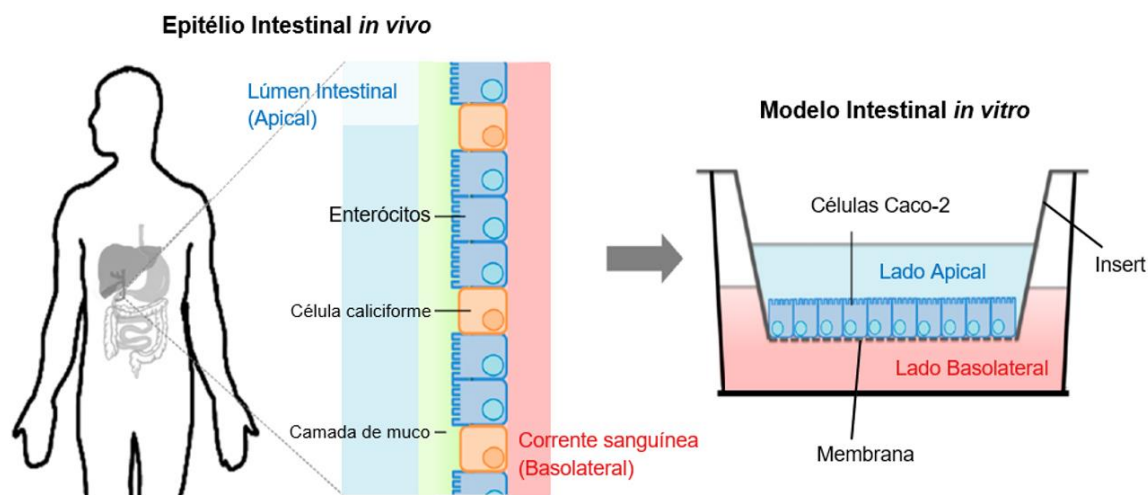


Figura 25 - Representação esquemática do modelo do intestino *in vitro* com as células da linha celular Caco-2, extraído e adaptado de Maeres *et al.* [213].

Como forma de estudar a permeação do colesterol e dos compostos dos extratos realizou-se um ensaio de permeação utilizando *inserts* e a linha celular Caco-2. O protocolo decorreu com base no trabalho anteriormente desenvolvido por Arantes *et al.* [37]. Muito sumariamente, as células cresceram em frascos T75 e foram recolhidas numa suspensão de meio RPMI de acordo com o descrito em 3.7. para os ensaios de segurança *in vitro*.

Na preparação do modelo da barreira intestinal, colocaram-se 2 mL de meio RPMI nos poços de uma microplaca de 12 poços, adicionaram-se *inserts* Falcon® (membrana PET e 0,40 µm poro) a cada um dos poços e cultivaram-se 0,5 mL da suspensão celular de Caco-2 (10^4 células/mL) dentro do *insert*. As células foram incubadas como descrito a 37 °C, com atmosfera de 5 % de CO₂. O meio foi renovado a cada 48/72 horas, até perfazer 23 dias.

Após os 23 dias, as células foram lavadas com *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) e a resistência foi lida com o Millicell® ERS-2 V-Ohm Meter (Darmstadt, Alemanha) e uma vez que a resistência foi superior a 250 Ω x cm² considerou-se que a barreira gastrointestinal estava formada [214].

De modo a avaliar a permeação dos compostos presentes nos extratos e NPs com extrato encapsulado (NPs Aramé) na barreira gastrointestinal e a permeação do colesterol na presença dos extratos e NPs foram realizados diferentes ensaios colocando do lado apical das células Caco-2 diferenciadas soluções do extrato de Aramé, Nori, Fucus e NPs vazias 0,3 mg/mL em HBSS e NPs Aramé 0,33 mg/mL em HBSS, na ausência e na presença de 5,2 mM de colesterol. No lado basolateral foi colocada solução de HBSS e as células foram incubadas a 37 °C, com atmosfera de 5 % de CO₂, durante 6 horas. Finalizado este período de incubação, recolheu-se a solução apical e basolateral de cada poço estas foram centrifugadas a 13400 rpm durante 5 min e analisadas por HPLC-DAD, seguindo o método descrito anteriormente (ponto 3.3.). Foram efetuados adicionalmente ensaios controlo em que as células foram incubadas somente com 5,2 mM de colesterol

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

(correspondendo a 100 % de permeação) e outros em que foram incubadas com 5,2 mM de colesterol e 0,1 mM do fármaco ezetimiba na presença e ausência de 0,3 mg/mL dos extratos e NPs vazias e 0,33 mg/mL de NPs Aramé.

A percentagem de colesterol foi calculada pela altura do pico do colesterol, assumindo que o colesterol no basolateral às 6 horas correspondeu aos 100 % de permeação. A partir deste valor, determinou-se a percentagem para as amostras em estudo com colesterol associado no basolateral às 6 horas.

A percentagem de compostos bioativos foi calculada pela altura do pico dos extratos e NPs, assumindo que os extratos e NPs no basolateral às 6 horas corresponderam a 100% de permeação.

Os ensaios foram realizados em triplicado.

3.12. Preparação das NPs de BSA Contendo Extrato de Aramé

Para a preparação das NPs de BSA vazias (NPs vazias) teve-se como base o artigo de Rebelo *et al.* [215] com algumas modificações. Numa primeira fase, dissolveram-se 100 mg de BSA em 4 mL de H₂O Milli-Q e ajustou-se o pH de 7-10 (Metrohm® 744 pH Meter, Barendrecht, Holanda) com uma solução de 0,1 mM de NaOH (pH final de 8,5). De seguida, esta solução foi adicionada, gota a gota, a 16 mL de etanol absoluto, sob agitação magnética a 500 rpm (2 mag magnetic e motion MIXdrive 15, Munique, Alemanha). Posteriormente, adicionou-se glucose (1,175 µL glucose/mg BSA) à solução anterior sob agitação magnética (500 rpm) e manteve-se esta reação durante 30 min. As NPs foram armazenadas a -4 °C para posterior caracterização. Para as NPs com extrato adicionou-se o extrato de Aramé em diferentes concentrações à solução de BSA (NPs Aramé). As NPs vazias e NPs Aramé foram preparadas em triplicado.

Posteriormente, realizou-se a caracterização física das NPs obtidas em termos de tamanho médio das partículas e índice de polidispersão por dispersão dinâmica de luz (DLS) (Zetasizer Nano S; Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido) e potencial zeta através da técnica de mobilidade eletroforética (Zetasizer Nano Z, Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Para tal, utilizou-se 25 µL da amostra de NPs e ressuspendeu-se com 1 mL de PBS à temperatura ambiente.

As NPs preparadas foram ainda caracterizadas em termos de citotoxicidade, atividade antioxidante, inibição da AChE, inibição da HMGR, permeação de compostos bioativos e permeação do colesterol na barreira gastrointestinal de acordo com o procedimento já descrito.

3.13. Determinação da Eficiência de Encapsulação

Como forma de determinar a eficiência de encapsulação (EE) para os três lotes de NPs Aramé, realizou-se a sua centrifugação a 3500 rpm por 5 min e o sobrenadante foi analisado por HPLC-DAD (método no ponto 3.3.) em que se escolheu o pico de maior intensidade de absorvência entre os 13 e 17 min. A percentagem de EE foi determinada através da Equação (9) [215].

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

$$EE (\%) = \frac{\text{Quantidade de Aramé inicial} - \text{Quantidade de Aramé no sobrenadante}}{\text{Quantidade de Aramé inicial}} \times 100 \quad (9)$$

3.14. Liofilização das NPs e Rendimento de Produção

Numa primeira fase, as NPs foram secas recorrendo a ar comprimido e foram posteriormente congeladas a $-2\text{ }^{\circ}\text{C}$ para subsequente liofilização (Heto® PowerDry LL3000, Milford, EUA) durante 24 horas a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Finalizado o processo de liofilização, as NPs foram sujeitas a um processo de pesagem, para determinar o rendimento de produção das NPs (%) através da Equação (10).

$$\text{Rendimento de produção (\%)} = \frac{\text{Quantidade de NPs liofilizadas}}{\text{Quantidade de componentes adicionados inicialmente}} \times EE \quad (10)$$

3.15. Caracterização Morfológica das NPs de BSA

A microscopia eletrónica de varrimento é uma técnica que analisa a amostra a ser examinada através de um feixe de eletrões gerado num ambiente de vácuo e lentes eletromagnéticas na mesma condição para criar uma imagem de alta resolução. Este método permite monitorizar o tamanho, distribuição do tamanho (dispersão das partículas), topografia e morfologia das amostras [216].

As NPs foram preparadas como descrito no ponto 3.13. Posteriormente, as NPs vazias foram centrifugadas a $17000 \times g$ por 20 min e as NPs Aramé foram centrifugadas a $10000 \times g$ por 15 min. As suspensões de NPs foram fixadas numa mistura de 3 % de paraformaldeído e 3 % de glutaraldeído em PBS a pH 8,5, durante 30 min. Depois de centrifugadas a $10000 \times g$, os *pellets* foram lavados três vezes no tampão da mistura fixadora e $10\text{ }\mu\text{L}$ das alíquotas das suspensões foram dispersas em lamelas redondas, previamente revestidas com poli-L-lisina e fixadas a uma lâmina porta-objetos do microscópio de varrimento. Em seguida, as amostras foram expostas a vapores de tetróxido de ósmio durante 15 min, desidratadas numa série crescente de etanol e secas com hexametildisilazano. Após revestidas com uma fina camada de ouro, as amostras foram observadas num microscópio de varrimento JEOL 5200LV (JEOL Ltd., Tóquio, Japão) a 20 kV e as imagens foram adquiridas digitalmente.

3.16. Ensaios de Eficácia e Segurança *in vivo*

Os ensaios *in vivo* foram realizados após aprovação dos órgãos competentes da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL) com 32 ratos Wistar machos (Charles River, Barcelona, Espanha). Os animais adaptaram-se às condições de laboratório durante 7 dias antes do início dos ensaios e foram mantidos a $22 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ com um ciclo controlado de 12 horas luz/escuro.

Numa primeira fase, o ensaio *in vivo* foi realizado com o extrato livre, com 12 animais e administração através da água de bebida (7 dias por semana, por 5 semanas). Cada rato bebeu cerca

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

de 50 mL de água por dia, para um peso médio por rato de 390 g. Os ratos foram divididos em 4 grupos: grupo 1, controlo negativo onde foi administrada apenas água (n=2); grupo 2, controlo positivo onde foi administrada ezetimiba pura (0,1 mg/mL) (n=3); grupo 3, teste 1 com o extrato de Aramé em estudo (0,1 mg/mL) (n=4); e grupo 4, teste 2 com uma mistura de ezetimiba pura e extrato de Aramé (0,1 mg/mL) (n=3).

O peso dos animais, glicémia (tiras Element NEO, OSANG Healthcare, Coreia do Sul) e consumo de ração foram verificados semanalmente. A taxa de mortalidade foi igualmente avaliada. Além disso, a urina foi também avaliada semanalmente com o objetivo de monitorizar a função renal e perceber se poderiam existir possíveis problemas renais associados (Tiras Combur, URITEST 10V, URIT Medical Electronic, Guilin, China). Como forma de aferir o colesterol inicial, recolheu-se uma amostra de sangue de um dos ratos de controlo negativo por punção cardíaca, centrifugou-se, obteve-se o soro e congelou-se para análise posterior. No último dia do ensaio procedeu-se ao sacrifício dos ratos recorrendo ao isoflurano (1000 mg/g) e recolheu-se uma amostra de sangue. O sangue recolhido foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min (BECKMAN GPR Centrifuge, Indianápolis, EUA), obteve-se o soro e determinou-se, a partir deste, o colesterol final e ureia. A determinação da ureia é de considerável importância, pois é um parâmetro utilizado na monitorização da atividade metabólica do organismo, em especial no que respeita ao normal funcionamento dos rins. Finalmente, o índice tecidual foi também determinado através da pesagem do fígado, rim e baço, recorrendo à Equação (11):

$$\text{Índice tecidual} = \sqrt{\frac{\text{Peso do órgão}}{\text{Peso do animal}}} \times 100 \quad (11)$$

Avaliado o efeito do extrato livre, procedeu-se à avaliação do efeito das NPs com extrato Aramé em 20 ratos Wistar machos, administração oral diária (5 dias por semana, por 4 semanas), por gavagem. Para tal dividiram-se os ratos em 4 grupos: grupo 1, controlo negativo onde foi administrada apenas água (n=5); grupo 2, teste 1 com o extrato de Aramé em estudo (1 mg/mL) (n=5); grupo 3, teste 2 com uma mistura de ezetimiba pura e extrato de Aramé (1 mg/mL) (n=5); e grupo 4, teste 3 com NPs extrato (11,1 mg/mL) (n=5). A concentração de NPs administradas foi baseada na eficiência de encapsulação (EE) obtida.

No último dia do ensaio, além dos ensaios anteriores, os órgãos excisados foram submetidos a uma avaliação histológica. As partes excisadas foram fixadas em formalina 10 %, embebidas em parafina e cortadas em secções de 5 µm, para a posterior coloração com hematoxilina-eosina (coloração H&E). As secções foram examinadas sob microscópio (Olympus BX51, Olympus Corporation, Tóquio, Japão) e as imagens foram obtidas utilizando uma câmara a cores (Olympus U-TV1X-2) e analisadas com o software Olympus analySIS® (Olympus Corporation, Tóquio, Japão).

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Parte do sangue recolhido foi utilizado na análise do colesterol e ureia final e a outra parte na análise da metabolómica e, para tal, o sangue foi centrifugado a 3500 rpm durante 10 min (BECKMAN GPR Centrifuge, Indianápolis, EUA) e o soro foi conservado a -20 °C.

3.17. Análise Metabolómica do Soro dos Ratos por LC-QTOF-MS

QTOF-MS é uma técnica analítica que combina os benefícios de dois analisadores de massa diferentes, a fragmentação de compostos com elevada eficiência através da tecnologia *Quadrupole* (Q) com a rápida velocidade de análise e a elevada capacidade de resolução de massa *Time-Of-Flight* (TOF). QTOF-MS é uma técnica amplamente aceite em vários campos de investigação biológica e farmacêutica, incluindo na identificação de metabolitos, análise de péptidos, descoberta de fármacos e na toxicologia. O acoplamento de QTOF-MS com a cromatografia líquida (LC) permite a simplificação da preparação de amostras e a deteção de uma gama mais ampla de substâncias químicas [217].

Para a análise metabolómica do soro dos ratos, começou por se realizar a preparação prévia das amostras de soro provenientes do ensaio de eficácia e segurança *in vivo*. Para tal, estas foram descongeladas em gelo, foram adicionadas a metanol (1:3) e, de seguida, homogeneizou-se a mistura no vortex Heidolph® REAX 2000 (Schwabach, Alemanha) durante 30 segundos. Centrifugou-se a 13000 x g por 15 min a 4 °C (Eppendorf® 5415 D, Hampton, EUA). Recolheu-se o sobrenadante, evaporou-se até à secura com recurso a ar comprimido à temperatura ambiente e guardou-se a -80 °C. No dia da análise por UHPLC, as amostras foram ressuspensas com uma solução de metanol e água ultra pura (1:1) e centrifugadas a 8000 x g por 5 min a 4 °C.

As análises cromatográficas foram realizadas num UHPLC Elute autosampler (Bruker, Bremen, Alemanha) utilizando uma coluna Intensity Solo 2 C18 RP (100 mm x 2,1 mm, 1,8 µm, Bruker, Bremen, Alemanha), em que foi injetado um volume de 5 µL de amostra (auto injetor) no sistema. O fluxo foi fixado em 0,250 mL/min e a coluna foi mantida a 35 °C. Cada amostra foi injetada 3 vezes, no mínimo (Tabela 2).

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Tabela 2 - Método utilizado na avaliação por LC-MS.

Tempo (min)	% Água + 0,1 % Ácido Fórmico	% ACN + 0,1 % Ácido Fórmico
0,0	95	5
1,5	95	5
13,5	25	75
18,5	0	100
21,5	0	100
23,5	95	5
30,0	95	5

Para a espectrometria de massa, foi utilizado um QTOF Impact II (Bruker, Bremen, Alemanha) e os dados foram adquiridos através do software de Análise de Dados 4.4. O método consistiu em varrimentos de MS/MS, no modo de ionização positiva. Os sinais foram registados no intervalo m/z 50-1500. A tensão capilar foi definida para 4000 V. O gás seco foi mantido a 6 L/min, a 200 °C. A energia da célula de colisão foi ajustada para 10 eV e 20 µL. A solução de calibração interna consistiu em 250 mL de água, 250 mL de isopropanol, 750 µL de ácido acético, 250 µL de ácido fórmico e 0,5 mL de solução de NaOH 1N.

3.18. Análise de Dados

Os resultados obtidos em todos os ensaios encontram-se representados pela média \pm desvio padrão, excetuando os resultados obtidos nos ensaios *in vivo* que estão representados pela média \pm desvio padrão relativo em relação à média (SEM). Também se realizou uma análise estatística de todos os resultados, recorrendo-se para tal à ferramenta de análise ANOVA presente no programa Microsoft Excel (Microsoft Office 365, Washington, D.C., EUA). No que respeita à análise estatística e identificação de compostos por LC-QTOF-MS foi utilizado o software Metaboscape 4.0 (Bruker, Massachusetts, EUA).

4. Resultados e Discussão

4.1. Obtenção dos Extratos de Algas

A partir da biomassa das algas comerciais e coletadas no Rio Tejo prepararam-se os respectivos extratos aquosos de Aramé, Nori e Fucus, de acordo com o procedimento descrito em 3.2. Após serem secos foram calculados os rendimentos indicados na Tabela 3.

Tabela 3 - Determinação do rendimento para os extratos secos recuperados após extração aquosa a partir da biomassa de algas.

Alga	Extrato seco (mg)	Biomassa (mg)	Rendimento (% m/m)
Aramé	220	333	66
Nori	100	200	50
Fucus	380	1000	38

Os extratos obtidos foram posteriormente fracionados em colunas de extração em fase sólida (SPE). Na Tabela 4 e Tabela 5 estão representados os rendimentos obtidos para as frações purificadas metanol (M) e água (A), respetivamente, tendo como base o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.2.

Tabela 4 - Determinação do rendimento após a purificação por SPE das frações purificadas metanol.

Fração Purificada	Fração recuperada (mg)	Extrato aplicado (mg)	Rendimento (% m/m)
Aramé M	32	240	13
Nori M	20	120	17
Fucus M	17	94	18

Tabela 5 - Determinação do rendimento após a purificação por SPE das frações purificadas água.

Fração Purificada	Fração recuperada (mg)	Extrato aplicado (mg)	Rendimento (% m/m)
Aramé A	171	240	71
Nori A	51	120	43
Fucus A	77	94	82

A partir da Tabela 3, foi possível observar que se obteve um maior rendimento para o extrato de Aramé, seguido do extrato de Nori e um menor para o extrato de Fucus. Quando comparando com as frações purificadas metanol por SPE (Tabela 4) percebeu-se que aconteceu o inverso,

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

existindo para a fração purificada metanol um maior rendimento associado ao extrato de Fucus, seguido do extrato de Nori e do extrato de Aramé.

Os rendimentos relativamente baixos obtidos nos extratos aquosos (Tabela 3) poderão ser devidos à biomassa das algas tornarem a solução muito espessa/densa tornando difícil a etapa de filtração, sendo o caso mais evidente o do extrato de Fucus. No caso das frações purificadas (Tabela 4 e Tabela 5), pode-se concluir que o SPE teve influência na separação dos compostos nos três extratos e que o rendimento obtido foi no geral muito baixo nas frações purificadas M em comparação com as frações purificadas A. Tal pode dever-se à diversidade de compostos presentes nos extratos aquosos, alguns destes compostos sendo mais polares são eluídos na etapa da fase aquosa e os menos polares são recuperados na fração purificada metanol.

4.2. Caracterização dos Extratos e Frações Purificadas

4.2.1. Caracterização dos Extratos por HPLC-DAD

Para a comparação dos extratos obtidos nas diferentes fases para as diferentes algas foi efetuada uma análise por HPLC-DAD de acordo com o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.3.

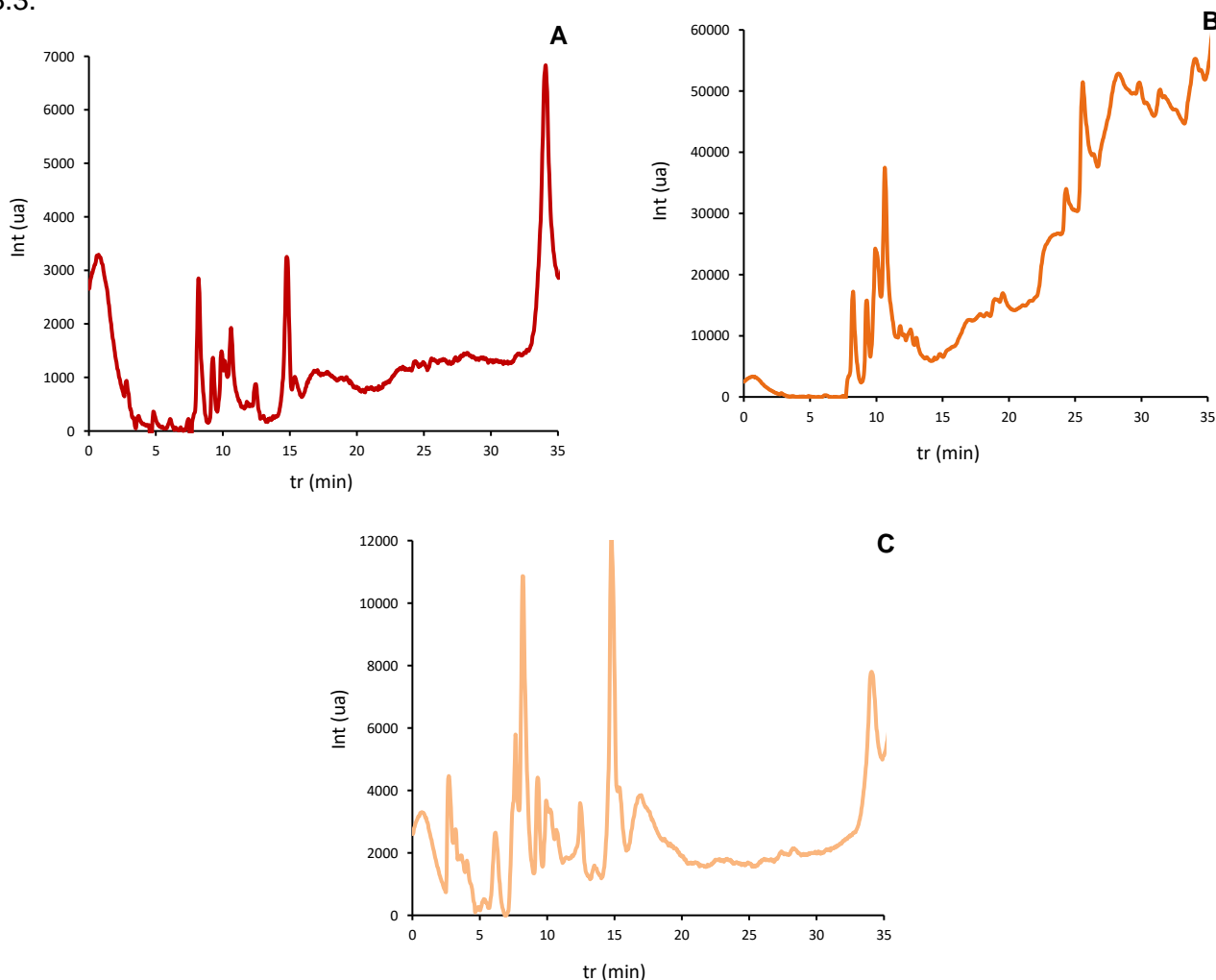


Figura 26 - Cromatogramas totais (250-600 nm) representativos do extrato de (A) Aramé 1 mg/ mL e frações purificadas (B) Aramé metanol 5 mg/mL e (C) Aramé água 5 mg/mL.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

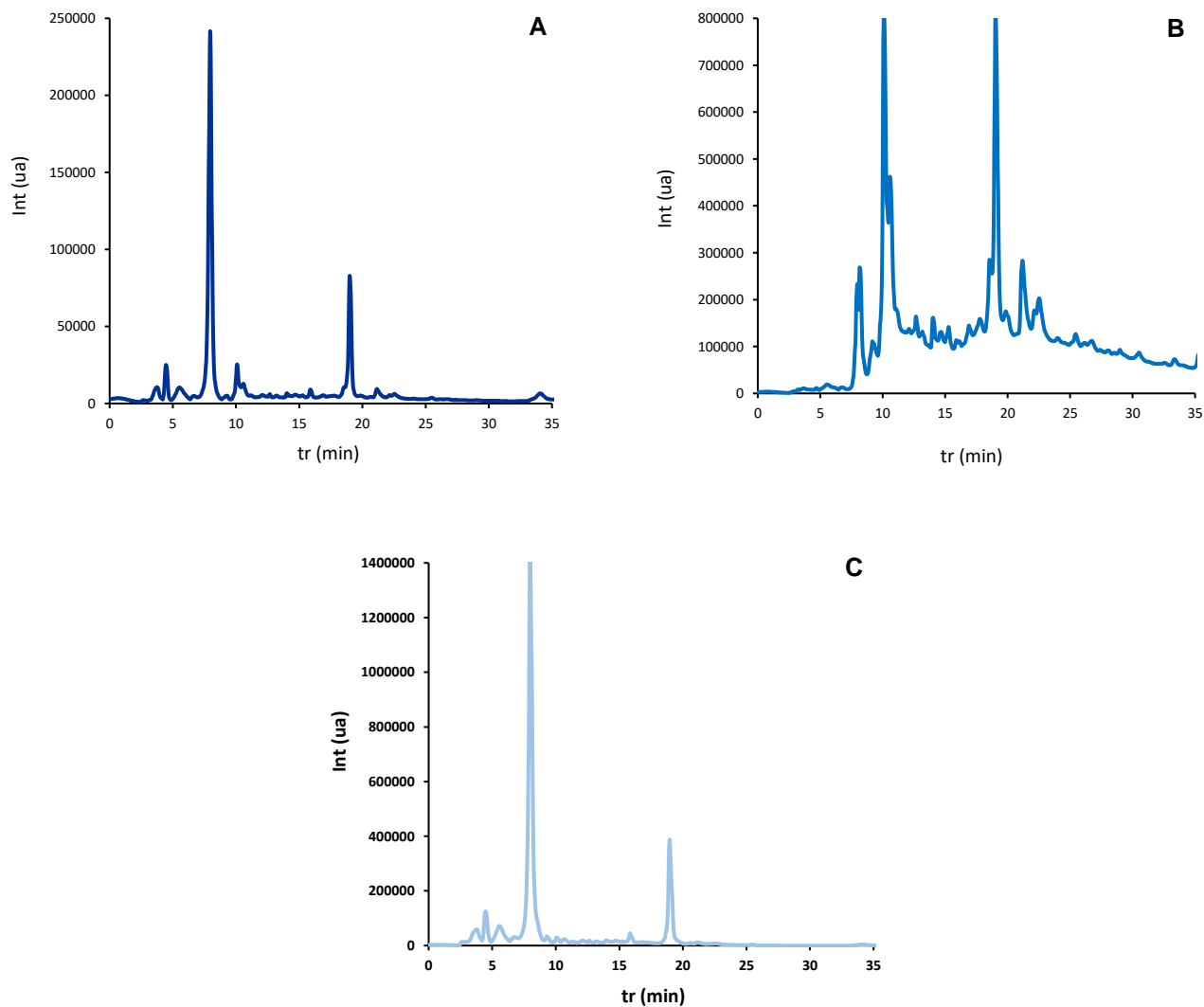


Figura 27 - Cromatogramas totais (250-600 nm) representativos do extrato de (A) Nori 1 mg/mL e frações purificadas (B) Nori metanol 5 mg/mL e (C) Nori água 5 mg/mL.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

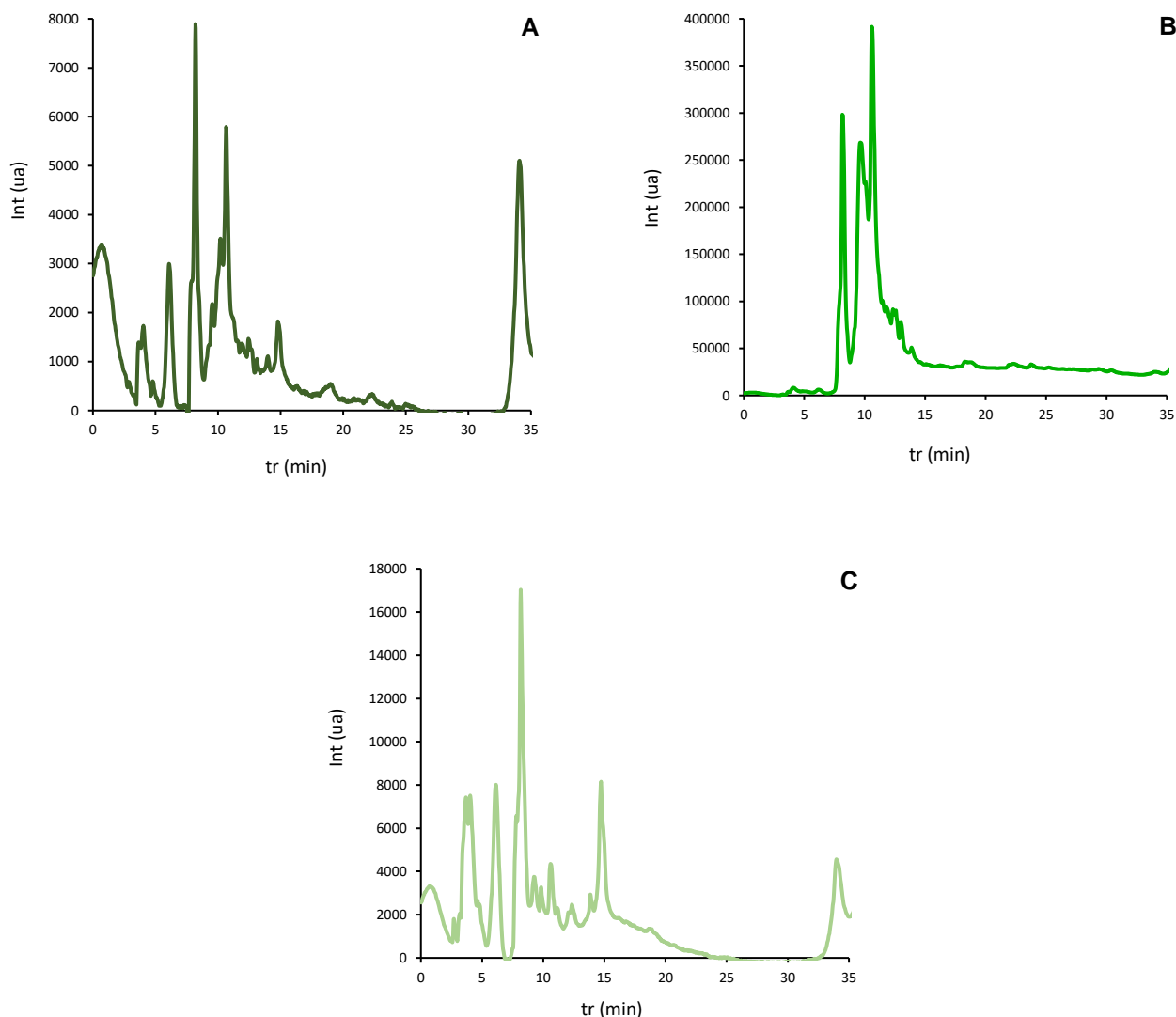


Figura 28 - Cromatogramas totais (250-600 nm) representativos do extrato de (A) Fucus 1 mg/mL e frações purificadas (B) Fucus metanol 5 mg/mL e (C) Fucus água 5 mg/mL.

Como se pode constatar nos cromatogramas das Figura 26, Figura 27 e Figura 28 foi possível verificar que a maioria dos compostos presentes nos extratos aquosos (A) estão mais presentes nas frações purificadas água (C) do que nas frações purificadas metanol (B). Tal pode significar que os extratos apresentam mais compostos polares que apolares, sendo por isso na purificação por SPE eluídos com a água. Também se pode verificar que os compostos das frações purificadas metanol (B) apresentaram compostos cujos picos apresentam maior intensidade que a generalidade obtida nas frações purificadas água (C), tendo-se conseguido com o metanol aumentar a concentração dos compostos apolares presentes nos extratos.

Na Figura 29 estão representados os cromatogramas a 266 nm dos extratos das três algas em estudo como forma de comparar com o cromatograma do floroglucinol (Figura Anexo 1).

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

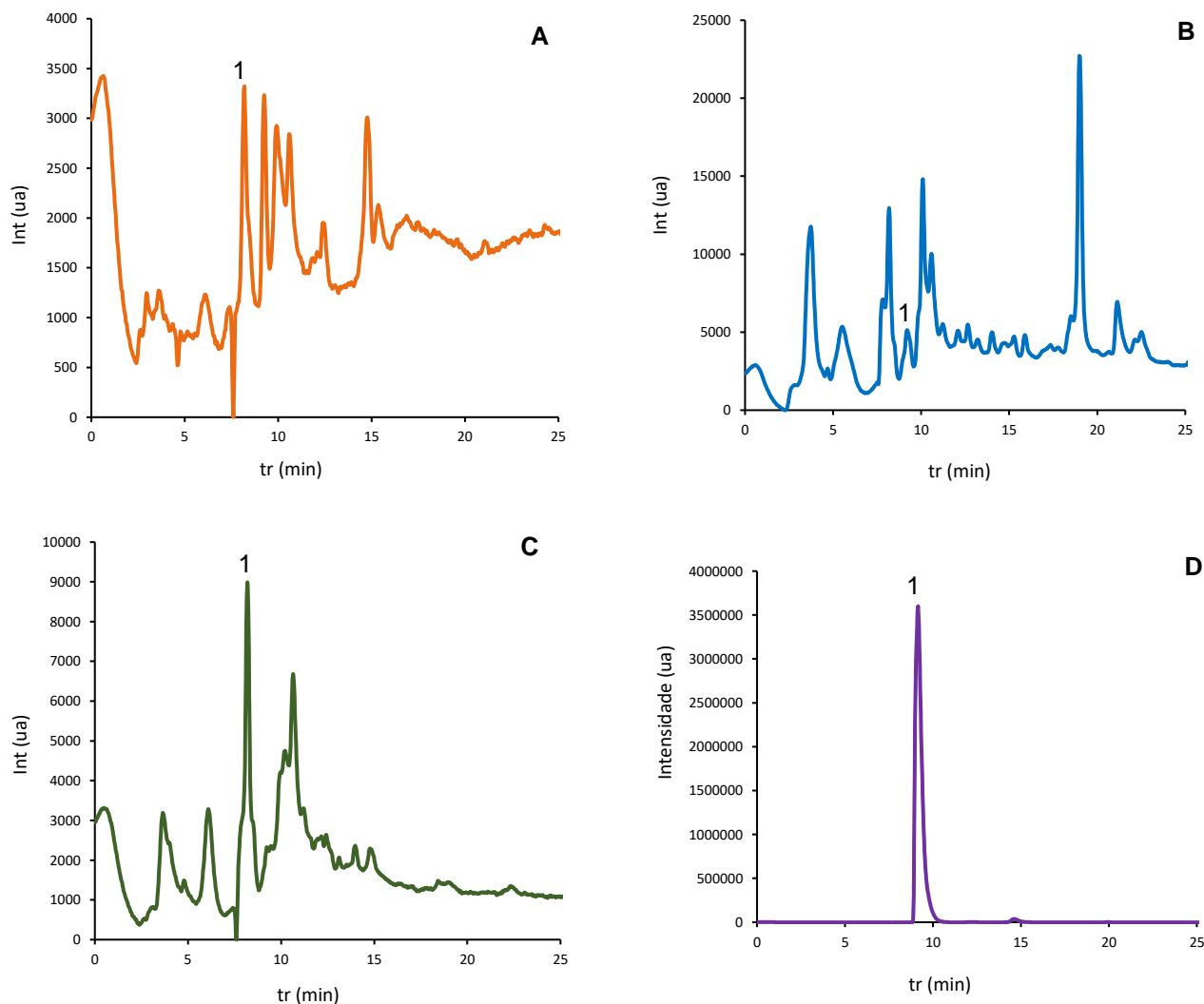


Figura 29 - Cromatogramas representativos dos extratos de (A) Aramé, (B) Nori e (C) Fucus, para uma concentração de 1 mg/mL e do (D) Floroglucinol (5 mg/mL), para um comprimento de onda de 266 nm.

Os florotaninos são compostos polifenólicos, frequentemente descritos nas algas castanhas, constituídos por unidades polimerizadas de floroglucinol [109]. Ao comparar o composto fenólico floroglucinol, com os extratos de algas em estudo, verificou-se que o floroglucinol apresentava um pico para os 9 min, aproximadamente, e os extratos de Aramé, Nori e Fucus também apresentaram um pico para este mesmo tempo de retenção (Figura 29). De modo que, foi possível concluir que os extratos apresentam floroglucinóis na sua composição ou derivados deste, ou seja, apresentam compostos fenólicos associados. O extrato de Aramé apresentou uma concentração de floroglucinóis de 0,003 mg/mg extrato seco, o extrato de Nori de 0,015 mg/mg extrato seco e o extrato de Fucus de 0,011 mg/mg extrato seco.

De acordo com a bibliografia, as algas castanhas Aramé e Fucus são reportadas como apresentando maior concentração de floroglucinóis [117]. No entanto, o método de extração e o local de origem da biomassa de alga pode alterar a sua composição [46] e, deste modo, foi a partir da alga vermelha Nori que se conseguiu obter um extrato com maior quantidade de floroglucinol.

4.2.2. Quantificação dos Fenóis Totais

Para a quantificação do conteúdo em fenóis totais nos diferentes extratos aquosos (Aramé, Nori e Fucus) obtidos e as respectivas frações purificadas por SPE em metanol e água (M e A) recorreu-se ao método de *Folin-Ciocalteu*, tendo como base o procedimento descrito no ponto 3.4.

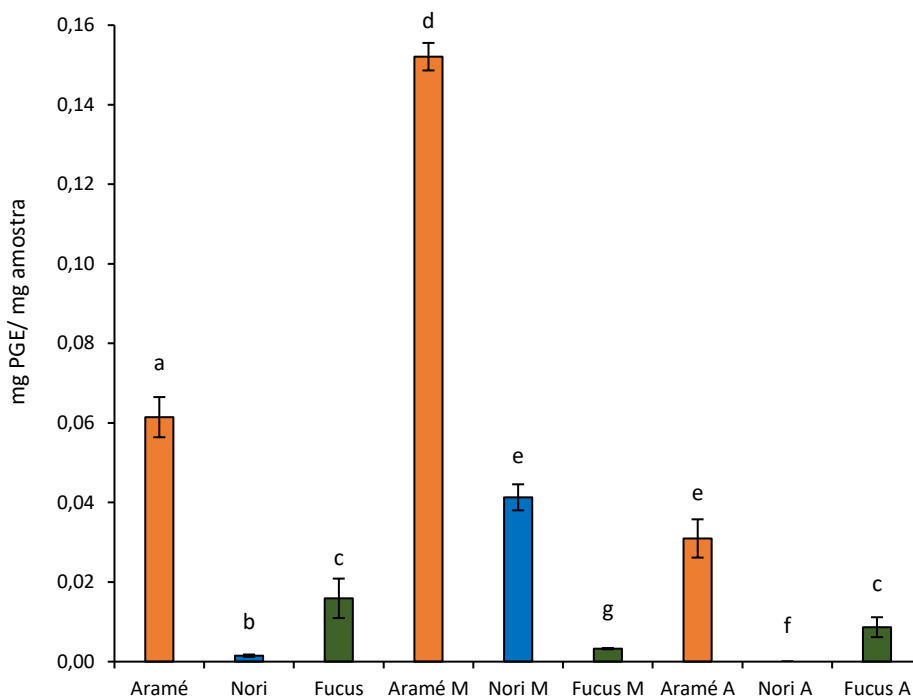


Figura 30 - Quantidade de fenóis totais determinada para os extratos de Aramé (10 mg/mL), Nori (10 mg/mL), Fucus (11,77 mg/mL) e frações purificadas metanol e água (10 mg/mL), com o respetivo desvio padrão. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Como se pode observar na Figura 30, a fração purificada de Aramé M apresentou uma maior quantidade de fenóis totais por mg de extrato e a fração purificada de Nori A a menor quantidade de fenóis totais. No caso do fracionamento obtiveram-se mais fenóis na fração purificada metanol que na fração água, para os extratos de Aramé e Nori, pois, no geral, os compostos fenólicos são apolares e, também de acordo com o obtido na análise por HPLC-DAD, os compostos maioritariamente presentes nestes cromatogramas devem ser deste tipo. No caso do extrato de Fucus tal não aconteceu, devido possivelmente à natureza mais polar dos compostos fenólicos presentes neste extrato. Esta fração foi também a que apresentou maior rendimento das frações purificadas A obtidas (Tabela 5), como referido anteriormente.

Quando comparando os resultados obtidos para os extratos aquosos com alguns dados disponíveis na bibliografia, observou-se um valor mais baixo para o extrato de Aramé de $0,0361 \pm 0,0005$ mg de equivalentes de floroglucinol (PGE)/mg de extrato recolhido na ilha Ulleung na Coreia do Sul [218] quando comparando com o valor obtido, pois apesar de o método de

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

quantificação ter sido o mesmo, esta diferença pode dever-se à origem do extrato, visto que algas iguais com uma diferente origem apresentam uma composição também ela diferente [46]. Para o extrato de Nori observou-se um valor mais elevado de $0,0057 \pm 0,0001$ mg PGE/mg de extrato [219] quando comparando com o obtido. Tal pode dever-se mais uma vez à diferente origem do extrato recolhido no litoral da Galiza em Espanha e de se ter efetuado um método de extração diferente, em que, no estudo presente na bibliografia, adicionou-se ao extrato seco uma mistura de metanol/água e HCl e, posteriormente, uma mistura de acetona/água. Como tal, o método de fracionamento utilizado não permitiu recuperar mais fenóis. Para o Fucus observou-se um valor muito semelhante de $0,0171 \pm 0,0021$ mg PGE/mg de extrato [46] quando comparando ao obtido, pois para além de o método utilizado ter sido semelhante, as algas foram ambas recolhidas no rio Tejo. Em todos os casos, neste trabalho optou-se por uma extração aquosa por ser menos prejudicial ambientalmente e poder simular formas de ingestão das referidas algas, em sopas ou bebidas, o que permite também analisar os efeitos associados ao consumo das referidas algas.

4.2.3. Quantificação das Proteínas Totais

Na quantificação de proteínas totais nos extratos e frações purificadas recorreu-se ao 2-D Quant Kit, tendo como base o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.5. O extrato aquoso de Fucus foi o único a apresentar um pequeno conteúdo em proteínas ($0,0074 \pm 0,0004$ mg de proteína/mg de extrato). Os restantes apresentaram uma quantidade abaixo do limite de deteção do método. Tendo em conta os resultados, os extratos obtidos não são ricos em proteínas. Apesar da biomassa das algas marinhas ser considerada uma fonte rica em proteínas que pode conter até 47 % com base no peso seco, os resultados demonstraram que apenas uma pequena parte dessas proteínas é obtida após extração por aquecimento da biomassa. Estes resultados podem ser explicados pelo facto de ser um desafio extrair proteínas da biomassa bruta das algas marinhas, pois a sua parede celular e a sua matriz mucilaginosa é um complexo resistente [220].

4.2.4. Quantificação dos Polissacáridos Totais

Para a quantificação de polissacáridos totais nos extratos preparados e frações obtidas após a purificação por SPE recorreu-se ao método do fenol-ácido sulfúrico, tendo como base o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.6.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

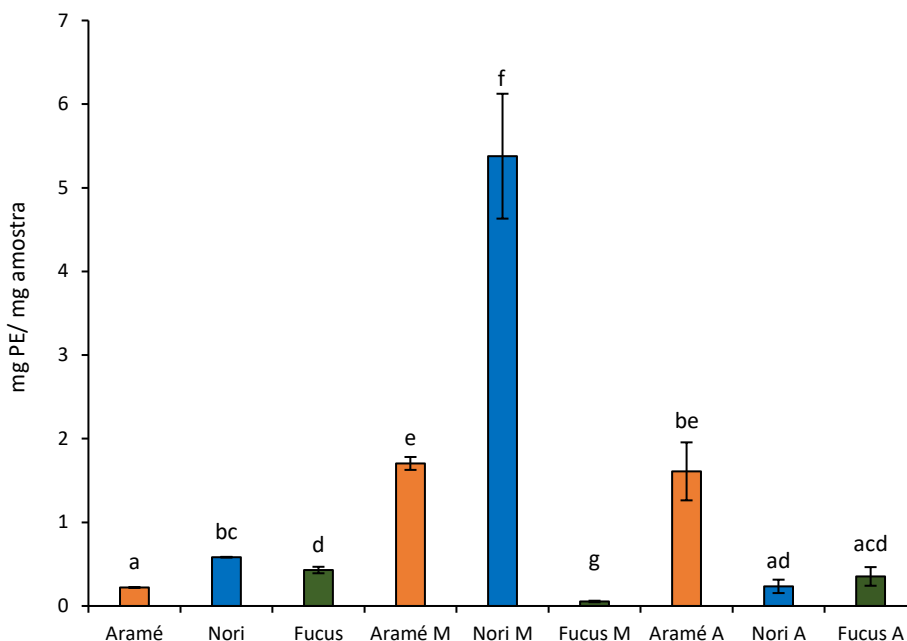


Figura 31 - Quantificação de polissacáridos totais determinada para os extratos de Aramé (2,5 mg/mL), Nori (2,5 mg/mL) e Fucus (5,89 mg/mL), frações purificadas Aramé metanol (5 mg/mL), Nori metanol (2,5 mg/mL) e Fucus metanol (10 mg/mL) e frações purificadas água (5 mg/mL), com o respetivo desvio padrão. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Na Figura 31, observa-se que a fração purificada de Nori M apresentou por mg de massa seca uma maior quantidade de polissacáridos totais ($5,38 \pm 0,75$ mg de equivalentes de ácido poligalacturónico (PE)/mg massa seca) e a fração purificada de Fucus M apresentou a menor quantidade de polissacáridos ($0,054 \pm 0,009$ mg de PE/mg massa seca). A partir dos resultados foi possível concluir que as frações purificadas de Aramé M e Nori M demonstraram ter uma maior quantidade de polissacáridos totais por mg de extrato, quando comparando com os respetivos extratos aquosos. No entanto, verificou-se uma redução na recuperação dos mesmos quando observando as frações purificadas A. No que respeita à obtenção das frações purificadas de Fucus, o SPE não demonstrou ser muito eficiente no que respeita à obtenção de polissacáridos.

Quando comparando os resultados obtidos para os extratos aquosos com alguns dados disponíveis na bibliografia, o extrato de *Laminaria digitata*, do subgrupo *Laminariales* tal como o extrato de Aramé, contém cerca de 48 % de polissacáridos na sua constituição, o extrato de Nori pode conter cerca de 50-76 % de polissacáridos totais e o extrato de Fucus contém cerca de 62 % [221]. Os valores da literatura coincidem com os obtidos, em que o extrato de Nori apresenta o maior valor de polissacáridos totais, reportados na bibliografia como sendo porfiranos [75], seguido do extrato de Fucus e Aramé.

4.3. Atividades Biológicas dos Extratos e Frações Purificadas

4.3.1. Ensaio de Segurança *in vitro*

Para determinar a segurança dos extratos e frações purificadas em estudo foi avaliada a citotoxicidade em linhas celulares HepG2 e Caco-2 recorrendo-se para tal ao método do MTT, tendo como base o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.7.

De acordo com o critério de Biok, as quatro categorias de citotoxicidade no que diz respeito aos extratos são: muito ativos ($IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$), moderadamente ativos ($IC_{50} > 20-100 \mu\text{g/mL}$), pouco ativos ($IC_{50} - 100-1000 \mu\text{g/mL}$) e inativos ($IC_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$) [222]. Neste caso, para a concentração de 1 mg/mL, os extratos e frações em estudo demonstraram uma viabilidade celular acima dos 50 %. Como tal, não demonstraram atividade citotóxica e, portanto, são considerados seguros para consumo.

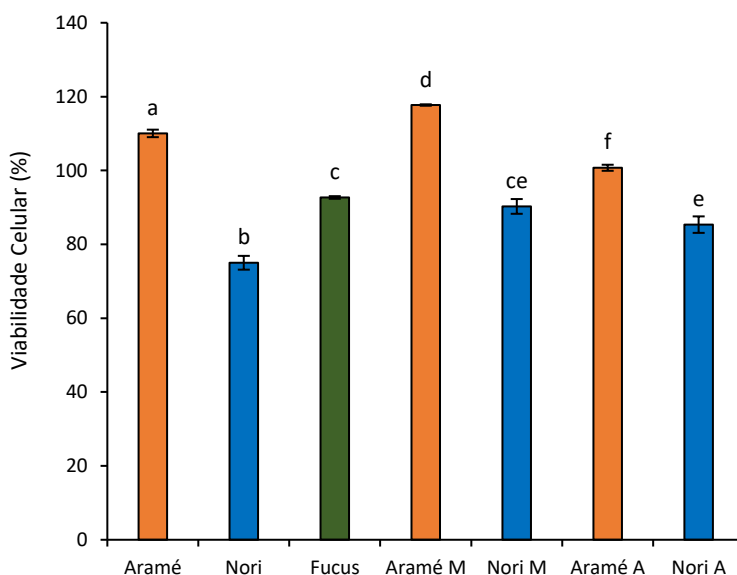


Figura 32 - Viabilidade celular das HepG2 quando em contato com os extratos de Aramé, Nori e Fucus e frações purificadas Aramé e Nori, para a concentração de 1 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Para as células HepG2 (Figura 32), foi possível concluir que o extrato de Nori apresenta uma menor viabilidade celular (aproximadamente 75 %), não sendo ainda assim considerado citotóxico. O extrato de Aramé de maior concentração, a fração purificada de Aramé M de ambas as concentrações e a fração purificada de Aramé A de maior concentração (Figura Anexo 5), demonstraram ter uma viabilidade celular acima dos 100 %, como tal não demonstraram apresentar morte celular e, pelo contrário, as células cresceram mais na sua presença, quando comparando com as células de controlo. Tal pode ser explicado por compostos presentes no extrato que promovem o crescimento celular.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

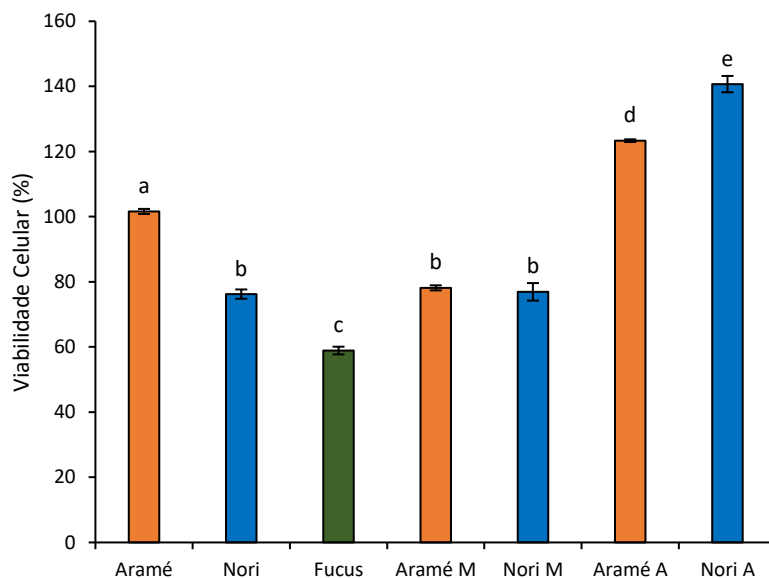


Figura 33 - Viabilidade celular das Caco-2 quando em contato com o extrato de Aramé, Nori e Fucus e frações purificadas Aramé e Nori, para a concentração de 1 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

No que respeita às células Caco-2 (Figura 33) foi possível observar que o extrato de Fucus demonstrou ter uma menor viabilidade celular (aproximadamente 60 %), não sendo ainda assim considerado citotóxico. Verificou-se que o extrato de Aramé de maior concentração, fração purificada de Aramé M de menor concentração e frações purificadas de Aramé A e Nori A de ambas as concentrações (Figura Anexo 6), demonstraram ter uma viabilidade celular acima dos 100 %, como tal não são citotóxicas.

Neste ensaio de viabilidade celular não se estudou qual o resultado do contato das frações purificadas de Fucus com as células Caco-2 e HepG2, pois ao se avaliar os restantes ensaios efetuados com as frações purificadas deste extrato percebeu-se que não se teve, no geral, resultados que o justificasse. Ao contrário dos extratos de Aramé e Nori, que tiveram melhores resultados associados, quando comparando com o extrato de Fucus e, por vezes, quando comparando com os respetivos extratos aquosos.

Os resultados obtidos estão de acordo com o esperado, uma vez que estas algas são habitualmente usadas na alimentação e, por isso, são consideradas seguras para consumo, o que se verificou com estes resultados.

4.3.2. Atividade Antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante dos extratos preparados e frações obtidas após a purificação por SPE recorreu-se ao método do DPPH, tendo como base o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.8.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

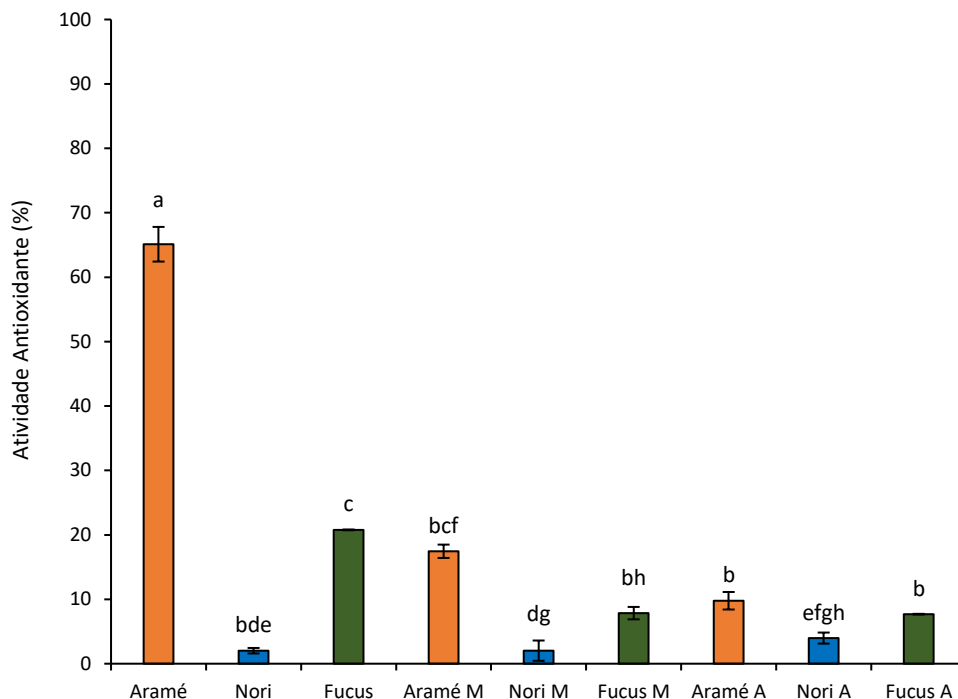


Figura 34 - Atividade antioxidante determinada para os extratos de Aramé (0,25 mg/mL), Nori (0,25 mg/mL), Fucus (0,29 mg/mL) e frações purificadas metanol e água (0,25 mg/mL), com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

A partir dos resultados obtidos (Figura 34) pode-se inferir que os extratos de Aramé e Fucus apresentaram uma maior atividade antioxidante para uma mesma concentração, quando comparando com o extrato de Nori. Sendo que, tanto para o extrato de Aramé como para o de Fucus se obteve uma maior atividade antioxidante para o extrato aquoso, quando comparando com as frações purificadas M e A. No caso do extrato de Nori, obteve-se uma baixa atividade antioxidante, semelhante no que respeita ao extrato aquoso e frações purificadas. Como tal, a purificação por SPE não resultou no enriquecimento de qualquer das frações obtidas.

Foi assim possível associar a alguns dos compostos fenólicos presentes a atividade antioxidante, visto que o extrato de Aramé apresentou a maior atividade antioxidante assim como a maior quantidade de fenóis totais, como referido, seguido do extrato de Fucus e do extrato de Nori, tal como habitualmente indicado na bibliografia [223].

Também foi calculado o EC_{50} para o extrato de Aramé, que corresponde à concentração do composto que apresenta uma atividade antioxidante de 50%, sendo que se obteve o valor de 0,22 mg/mL (Figura Anexo 7).

Quando comparando os resultados obtidos dos extratos aquosos com a bibliografia observa-se para o extrato de Aramé uma maior atividade antioxidante de $73,20 \pm 1,82$ % para uma concentração de 0,025 mg/mL e um menor EC_{50} de 0,002 mg/mL [224], quando comparando com os valores obtidos. As diferenças de valores podem dever-se à diferente origem das algas. Para a Nori os valores de atividade antioxidante referenciados são baixos, assim como os obtidos, de 18,71 % para uma

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

concentração de 1 mg/mL [225], apesar das origens diferentes. Para o Fucus o valor referenciado foi maior de 23 % para uma concentração de 0,1 mg/mL [46], tal pode ser devido às diferentes condições de extração, tal como a temperatura empregue.

Nos ensaios seguintes apenas se usaram os extratos aquosos, pois não se verificou um ganho quando se utilizaram as frações purificadas.

4.3.3. Inibição da AChE

As CVDs encontram-se associadas a um risco acrescido no desenvolvimento de doenças neurodegenerativas [143,144]. A inibição da AChE é um dos tratamentos da AD e de perturbações gastrointestinais graves [146,226]. Como tal, esta é selecionada como alvo de abordagens terapêuticas visando a sua inibição [146]. Para estudar a atividade da AChE e perceber qual dos extratos em estudo apresenta um maior potencial na sua inibição, recorreu-se à reação de Ellman, tendo como base o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.9. Diferentes compostos naturais, incluindo compostos fenólicos, têm demonstrado ser potentes inibidores da enzima AChE [227]. Como forma de perceber se a inibição da enzima AChE pelos extratos podia dever-se à presença de compostos fenólicos, mais especificamente de floroglucinol, realizou-se o ensaio com este. A concentração da amostra de floroglucinol utilizada foi de 0,1 mg/mL, pois este encontra-se presente nos extratos de algas numa quantidade inferior a 1 %.

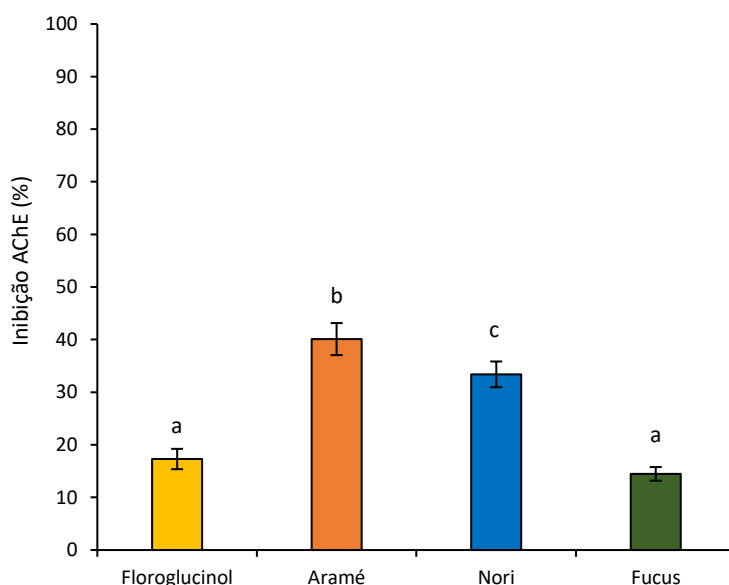


Figura 35 - Inibição da AChE para os extratos de Aramé (3 mg/mL), Nori (1,5 mg/mL) e Fucus (1,177 mg/mL) e amostra de floroglucinol (0,1 mg/mL), com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Na Figura 35 foi possível observar que a % de inibição da enzima AChE para o extrato de Aramé foi cerca de metade da obtida para o extrato de Nori, quando avaliando na mesma

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

concentração. Como tal, o extrato de Nori apresentou o maior potencial de inibição da enzima AChE. O floroglucinol utilizado numa concentração de 0,1 mg/mL apresentou uma baixa capacidade em inibir a enzima AChE, sendo que a quantidade de floroglucinol presente no extrato de Nori foi de aproximadamente de 1 %, ou seja, 0,015 mg/mL. De modo que, a capacidade de inibição do floroglucinol no extrato de Nori foi ainda muito menor. Portanto, foi possível concluir que o floroglucinol não é o único a contribuir para a inibição da AChE, mas possivelmente outros compostos presentes no extrato, nomeadamente os polissacáridos em que esta fração demonstrou ser rica [228].

Quando comparando os resultados obtidos dos extratos com estudos anteriores observa-se para o extrato de Aramé uma maior inibição da AChE de $68,01 \pm 1,37$ % para uma concentração de 0,025 mg/mL [224], quando comparando com os valores obtidos. Tal pode dever-se à diferente origem das algas, proveniente de Gangwon na Coreia do Sul. Para a Nori observa-se uma maior inibição da enzima AChE de $26,6 \pm 2,6$ % para uma concentração de 0,01 mg/mL [229], quando comparando com os valores obtidos. Tal pode dever-se ao facto de as algas apresentarem uma origem diferente, sendo proveniente do mar do Japão. Para o Fucus, pela bibliografia sugere-se um menor valor de inibição de $4,20 \pm 0,36$ % para uma concentração de 1 mg/mL [46]. Neste caso a diferença pode dever-se às diferentes condições de extração, tal como a temperatura empregue, o que pode justificar a diferença de valores de inibição.

Os valores obtidos para a inibição da enzima AChE indicam que as algas em estudo, quando consumidas numa refeição, podem acelerar o trato digestivo, evitando assim a absorção do colesterol exógeno [46]. Observando os resultados obtidos, foi possível concluir que estes extratos, ao serem capazes de inibir a enzima AChE, demonstram ser uma opção natural a ter em conta no que respeita à prevenção e diminuição da progressão de doenças neurodegenerativas, sendo o extrato de Nori a escolha mais promissora para este efeito, sendo obviamente necessários mais estudos para aprofundar esta atividade.

4.3.4. Inibição da HMGR

A biossíntese do colesterol endógeno tem como principal enzima a HMGR, sendo que quando em excesso encontra-se associada a um aumento dos níveis de colesterol plasmático e consequentemente a um aumento do risco de CVDs. Para estudar a atividade da HMGR e perceber qual dos extratos em estudo apresenta um maior potencial na sua inibição, recorreu-se ao kit da Sigma, tendo como base o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.10. Também se utilizou o inibidor pravastatina, como termo de comparação relativamente aos extratos testados.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

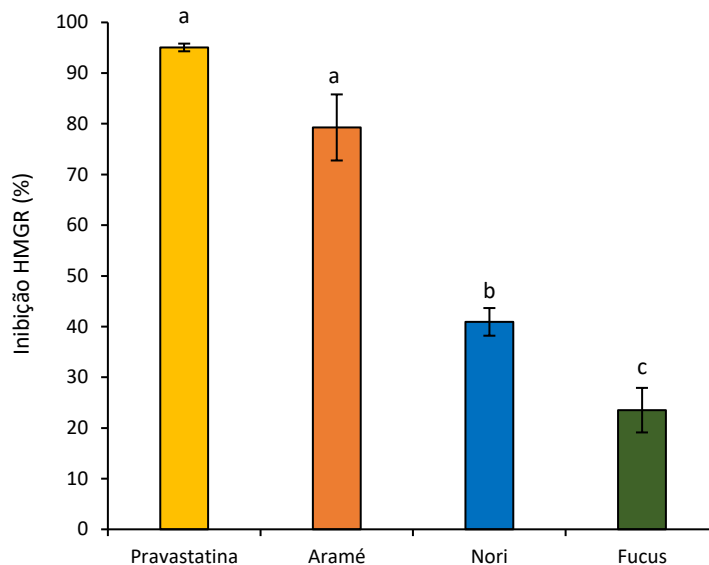


Figura 36 - Inibição da HMGR para a amostra de pravastatina e diferentes extratos em estudo, para uma concentração de extrato de Aramé, Nori e Fucus de 0,25 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Tendo em conta a Figura 36, os resultados demonstram que para uma mesma concentração o extrato de Aramé demonstra ter uma maior % de inibição da enzima HMGR, seguido do extrato de Nori e Fucus. O extrato de Aramé, à concentração utilizada, apresenta % de inibição semelhante ao do fármaco testado. Como tal, o extrato de Aramé demonstra ser uma possível alternativa natural à pravastatina no que respeita à prevenção e diminuição do risco de CVDs.

Quando comparando os resultados obtidos dos extratos aquosos com a bibliografia observa-se para o extrato de Fucus uma menor inibição da HMGR de $1,07 \pm 0,65$ % para uma concentração de 0,01 mg/mL [46], quando comparando com os valores obtidos. Neste caso, a diferença de valores de inibição pode dever-se às diferentes condições no método de extração. Para os extratos de Aramé e Nori não foram encontrados dados na bibliografia, como tal, tendo em conta a pesquisa bibliográfica efetuada, depreende-se que este ensaio é inovador no que respeita às duas algas em estudo.

Observando os resultados obtidos, foi possível concluir que o extrato de Aramé apresenta o maior potencial de inibição da HMGR. Como tal, esta poderá atuar ao nível do fígado com efeitos benéficos sobre a redução da biossíntese do colesterol e, portanto, apresenta potencial antihipercolesterolémico.

4.3.5. Ensaio de Permeação na Barreira Gastrointestinal

A hipercolesterolemia é caracterizada pelo elevado nível de colesterol plasmático e a sua redução encontra-se associada à diminuição do risco CVDs. A procura por terapias alternativas aos

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

fármacos atuais na redução do risco de CVDs é a justificativa para a testagem de produtos naturais [30].

A linha celular Caco-2 é usada como modelo da barreira gastrointestinal, pois diferencia-se num estado funcional e morfológicamente parecido com os enterócitos humanos [213]. De modo a avaliar se os extratos das algas apresentavam potencial antihipercolesterolémico realizou-se um ensaio de permeação utilizando *inserts* e a linha celular Caco-2 diferenciada, tendo como base o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.11. Nestes ensaios foi ainda avaliada a percentagem de permeação dos extratos na barreira gastrointestinal.

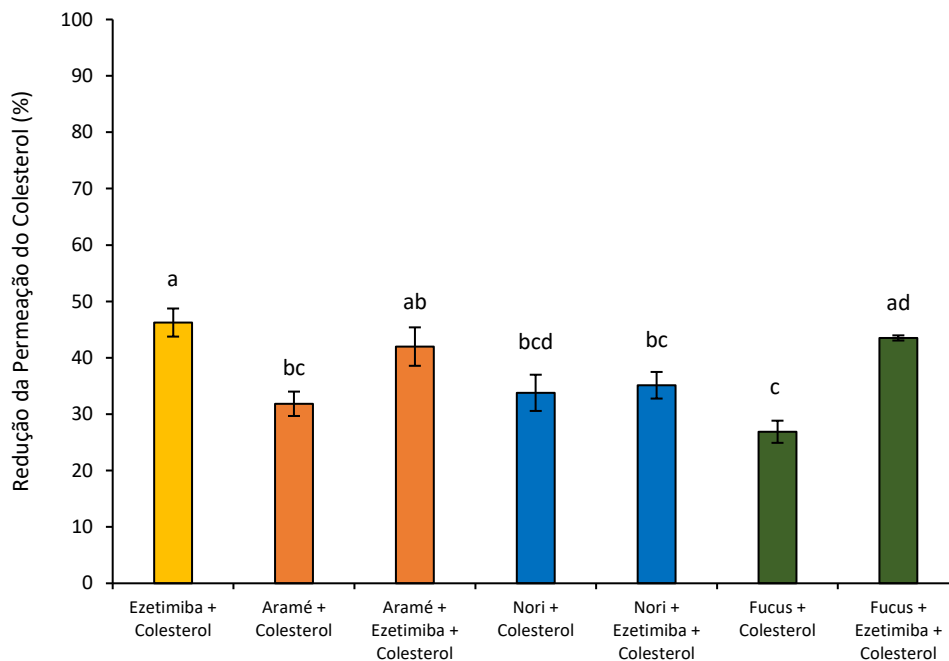


Figura 37 - Redução da permeação do colesterol para a ezetimiba e diferentes extratos em estudo, tendo a solução de colesterol no basolateral como o 100% da permeação, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Como se pode observar na Figura 37, ao se comparar a ezetimiba com os extratos por si só, foi possível afirmar que a ezetimiba foi mais eficiente na redução da permeação do colesterol relativamente aos extratos, o que era esperado, pois já foi comprovada a sua capacidade e eficácia como fármaco na redução do colesterol [37,42]. Os extratos de Nori, Aramé e Fucus demonstram ter eficiência semelhante na redução da permeação do colesterol.

No que respeita à utilização simultânea de qualquer um dos extratos com o fármaco ezetimiba, obteve-se um aumento na permeação do colesterol relativamente à utilização isolada dos extratos. No entanto, os valores obtidos para o extrato de Aramé com ezetimiba e Fucus com ezetimiba são semelhantes aos obtidos com ezetimiba isoladamente, o que significa que o consumo destes extratos não interfere com a ação do fármaco. Em oposição ocorreu uma diminuição da eficácia na redução da permeação do colesterol da ezetimiba, na presença do extrato Nori, relativamente à

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

utilização da ezetimiba isoladamente. Tal pode ser explicado pelo facto de que alguns alimentos interferem com a ação dos fármacos [230].

Quando comparando o extrato de Nori e o extrato de Nori com ezetimiba foi possível observar que estes não apresentaram uma diferença significativa entre si no que respeita à redução na permeação do colesterol, e que o seu efeito foi inferior ao exibido pela monoterapia com ezetimiba. Pode sugerir-se que os compostos presentes neste extrato promovem a redução da ação da ezetimiba porque se podem ligar à ezetimiba reduzindo o seu efeito na inibição da NPC1L1, a proteína responsável pela entrada de colesterol nos enterócitos.

Quando comparando os resultados obtidos dos extratos com a bibliografia observou-se para o extrato de Fucus uma maior redução da permeação de colesterol de $45,3 \pm 4,4$ % [46], para uma concentração de 0,25 mg/mL, quando comparando com os valores obtidos. Neste caso a diferença pode dever-se às diferentes condições de extração. Para os extratos de Aramé e Nori não foram encontrados estudos referentes a ensaios de permeação do colesterol *in vitro*, sugerindo que este ensaio é inovador no que respeita às duas algas em estudo.

Foi possível assim concluir que os extratos não são tão eficientes quanto a ezetimiba na redução da permeação do colesterol. No entanto quanto utilizados na forma livre têm algum efeito nesta redução, o que é uma vantagem face aos efeitos secundários, como tal estes seriam uma boa alternativa para a redução da utilização da ezetimiba [30].

Posteriormente, foi avaliada a permeação dos compostos presentes nos extratos, com o objetivo de se poder verificar se, caso se dê o caso do consumo destes extratos na presença de colesterol, estes conseguem permear a barreira gastrointestinal e se consequentemente podem ter efeitos noutros órgãos ou tecidos do organismo.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

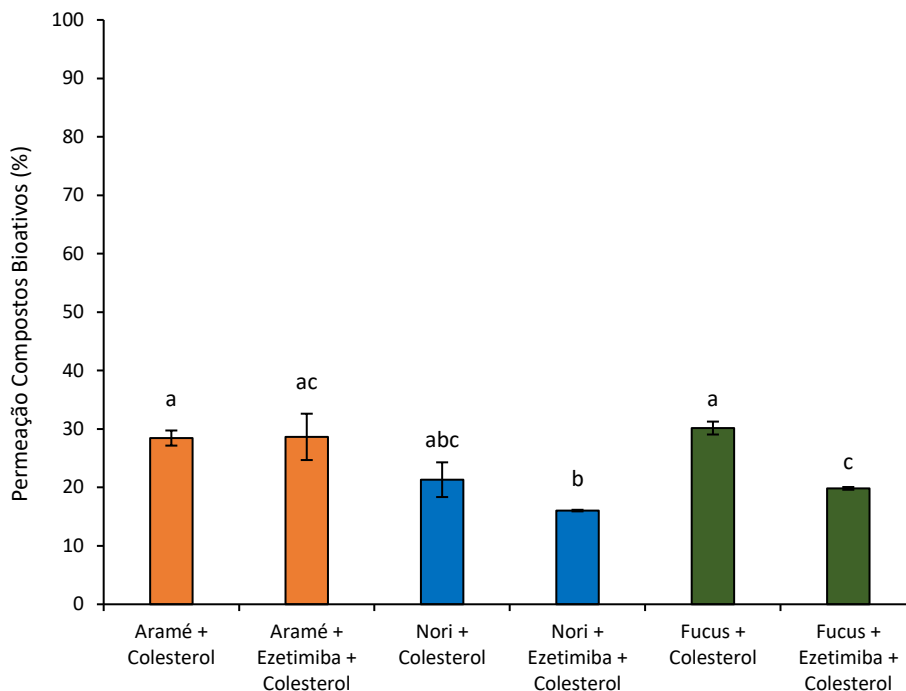


Figura 38 - Permeação dos compostos bioativos dos extratos em estudo, tendo a solução do basolateral da respetiva alga como o 100% de permeação, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Como se pode observar a partir dos resultados obtidos na Figura 38, foi possível concluir que os compostos bioativos presentes nos três extratos em estudo apresentaram capacidade de atravessar a barreira gastrointestinal quando na presença de colesterol e colesterol com ezetimiba. No entanto, de uma forma geral, a permeação de compostos demonstrou ser reduzida (entre 15 a 30 %). Sendo que resultados de permeação semelhantes foram encontrados num estudo realizado com decocções de *Vernonia condensata* [37].

Adicionalmente verificou-se que na presença de colesterol se obteve uma maior permeação dos compostos presentes nos extratos de Aramé e Fucus, do que dos compostos presentes no extrato de Nori. Enquanto que, na presença de colesterol e ezetimiba, os compostos do extrato de Aramé demonstram ter uma maior facilidade de permeação, quando comparando com os compostos presentes nos extratos de Nori e Fucus.

Quando comparando a permeação dos compostos dos extratos com a permeação dos compostos dos extratos com ezetimiba, na presença de colesterol, foi possível concluir que se tem uma diminuição da permeação na presença de ezetimiba, sendo a exceção o extrato de Aramé, que apresentou um valor bastante semelhante em ambos os casos. Poder-se-á propor que a ezetimiba, ao promover esta redução da permeação dos compostos presentes nos extratos Fucus e Nori pode estar diretamente associada com o facto de os extratos poderem ter os mesmos transportadores que o colesterol, como a proteína NPC1L1, em que a ezetimiba está a cumprir a sua função de inibidor, ligando-se à proteína NPC1L1, dificultando a ligação dos extratos a esta, reduzindo assim a

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

capacidade de permeação dos extratos pela barreira gastrointestinal [46] ou pode ainda dever-se ao facto de a ezetimiba poder inibir outras proteínas transportadoras destes compostos [37]. Os compostos da Aramé podem ter outro processo, para além deste, visto não aparentarem ter a sua permeação afetada.

Pode concluir-se que os compostos bioativos presentes nas algas em estudo têm dificuldade em permear a membrana gastrointestinal, sendo que tal pode ser devido a apresentarem uma maior dimensão e que apenas os compostos mais pequenos consigam penetrar na membrana celular e ser ativos no interior da célula.

Tabela 6 – Resumo dos principais valores obtidos para os ensaios efetuados, com o respetivo desvio padrão. Letras diferentes num mesmo ensaio indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras.

	Aramé	Nori	Fucus	Pravastatina	Ezetimiba
Fenóis Totais	0,061 ± 0,005 ^a	0,0015 ± 0,0003 ^b	0,016 ± 0,005 ^c	NA	NA
Polissacáridos Totais	0,221 ± 0,001 ^a	0,583 ± 0,004 ^b	0,43 ± 0,04 ^c	NA	NA
Atividade Antioxidante	65 ± 3 ^a	2,0 ± 0,4 ^b	20,8 ± 0,1 ^c	NA	NA
Inibição AChE	40 ± 3 ^{a*}	33 ± 2 ^{b**}	14 ± 1 ^{c***}	NA	NA
Inibição HMGR	79 ± 7 ^a	41 ± 3 ^b	24 ± 4 ^c	95 ± 1 ^a	NA
Redução Permeação Colesterol	32 ± 2 ^a	34 ± 3 ^a	27 ± 2 ^a	NA	46 ± 2 ^b
Permeação Compostos Bioativos	28 ± 1 ^a	21 ± 3 ^a	30 ± 1 ^a	NA	NA

* 3 mg/mL; ** 1,5 mg/mL; *** 1,117 mg/mL; NA: Não Aplicável

A encapsulação dos extratos em estudo em NPs parece ser uma estratégia eficiente para melhorar a biodisponibilidade dos compostos presentes nestes extratos, em particular o extrato de Aramé que apresentou os melhores resultados em praticamente todas as atividades analisadas, em particular na redução da permeação do colesterol e na inibição da HMGR, mas cuja permeação na barreira intestinal fica abaixo de 30 % (Tabela 6). Por conseguinte, esta alga foi encapsulada em NPs com o objetivo de facilitar a sua administração, melhorar a permeação e as propriedades associadas. A opção foi pela encapsulação em NPs de BSA, visto ser uma proteína muito usada na encapsulação de compostos bioativos devido à sua abundância, baixo custo, fácil purificação, não imunogenicidade, não toxicidade, propriedades de ligação versáteis, metabolizada *in vivo* para produzir produtos de degradação inócuos, tendo uma elevada aceitação na indústria farmacêutica [231] e homologia estrutural à albumina de soro humano [232].

4.4. Síntese e Caracterização das NPs de BSA

4.4.1. Caracterização das NPs de BSA

Foram obtidas NPs de BSA com extrato de Aramé encapsulado (NPs Aramé) para três lotes, em que apenas se variou a massa de Aramé adicionada. Obteve-se também NPs de BSA vazias (NPs vazias) sem extrato encapsulado, que serviram como controlo. Estas NPs foram caracterizadas de acordo com o seu tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta, os resultados obtidos encontram-se presentes na Tabela 7. No que respeita à administração oral, é importante a obtenção de NPs com um tamanho relativamente pequeno, pois permitem a redução da imunogenicidade *in vivo* [171], conseguem penetrar mais facilmente nas barreiras biológicas [233] e a absorção intracelular é mais eficiente [167]. Além disso, é importante que tenham um índice de polidispersão mais próximo do valor 0 pois significa que a amostra é perfeitamente uniforme relativamente à distribuição [234]. Finalmente, um potencial zeta neutro favorece uma maior absorção das NPs pelo tecido gastrointestinal, em particular no caso dos ratos, no que respeita à administração oral por gavagem [235].

Tabela 7 - Valores médios de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das NPs vazias e NPs Aramé, com o respetivo desvio padrão.

	V _{NPs BSA} (µL)	Tamanho (nm)	Índice Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
NPs Vazias	25	104 ± 8	0,285 ± 0,028	-12,3 ± 2,1
Lote 1 (10 mg Aramé)	25	226 ± 21	0,471 ± 0,101	-13,0 ± 1,2
Lote 2 (25 mg Aramé)	25	71 ± 4	0,631 ± 0,181	-11,6 ± 1,2
Lote 3 (50 mg Aramé)	25	85 ± 7	0,713 ± 0,080	-15,8 ± 4,4

A partir da Tabela 7 foi possível concluir que, quando comparando os 3 lotes de NPs Aramé, a menor massa de Aramé utilizada, lote 1, correspondeu ao maior tamanho de NPs obtidas e, por outro lado, ao menor índice de polidispersão. Sendo que, para este mesmo lote, obteve-se um maior tamanho de NPs, um maior índice de polidispersão e um semelhante potencial zeta, quando comparando com as NPs vazias. O maior tamanho das NPs Aramé pode dever-se ao facto de estas apresentarem um maior índice de polidispersão e, como tal, uma maior agregação de partículas. As partículas agregadas podem ser contabilizadas como uma só partícula, o que erradamente pode traduzir-se num maior tamanho associado. Apesar de as NPs Aramé do lote 1 apresentarem um maior índice de polidispersão que as NPs vazias, ambas podem ser consideradas amostras monodispersas, visto que o índice de polidispersão demonstra ser inferior a 0,7 [236]. Quando utilizando a BSA a pH 8,5 obtém-se um potencial zeta menor que 0. No entanto, NPs que apresentem um valor de potencial zeta entre cerca de -10 e +10 mV são consideradas como sendo neutras [237], permitindo

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

que as NPs tenham um tempo de circulação no sangue mais prolongado, sem serem detetadas pelas células imunitárias [238].

As NPs vazias e NPs Aramé foram posteriormente analisadas por microscopia eletrónica de varrimento, tendo como base o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.15.

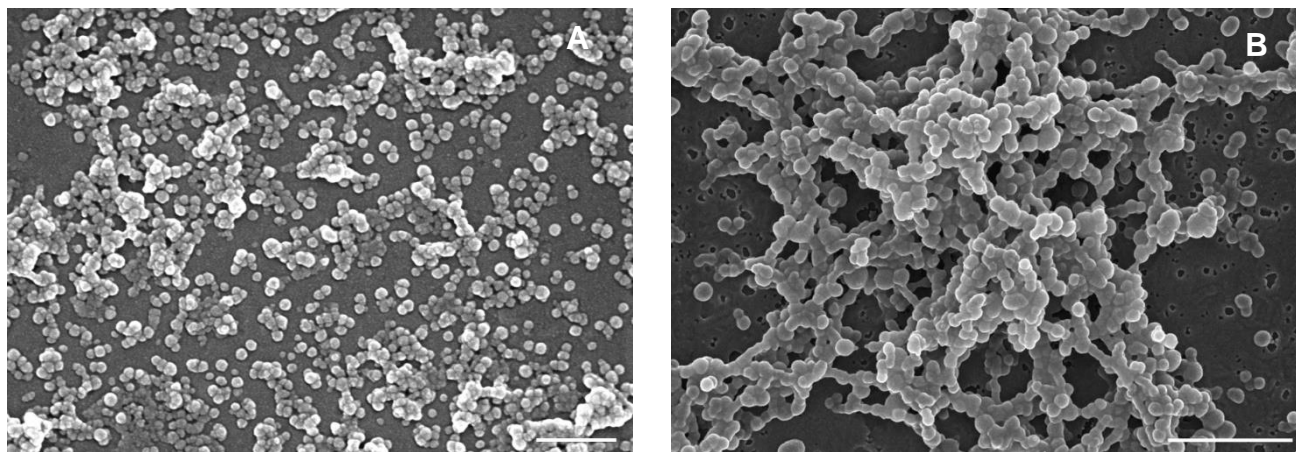


Figura 39 - Microscopia Eletrónica de Varrimento das (A) NPs vazias (1 µm) e (B) NPs Aramé (1 µm).

Através da observação das imagens das NPs de BSA obtidas por microscopia eletrónica de varrimento (Figura 39) foi possível concluir que as NPs vazias e NPs Aramé apresentaram uma forma esférica com uma superfície lisa. No entanto, as NPs vazias demonstraram ter uma distribuição mais uniforme e um tamanho ligeiramente menor, quando comparando com as NPs Aramé, tal encontra-se em concordância com os resultados de DLS presentes na Tabela 7.

A eficiência de encapsulação (EE) é a percentagem de fármaco que é aprisionada com sucesso na micela ou nanopartícula [239]. Esta foi determinada para os 3 lotes de NPs Aramé e depreendeu-se que as NPs com 10 mg de Aramé encapsulada apresentaram a maior EE e que o extrato de Aramé foi encapsulado com sucesso nas NPs de BSA com um valor 96 %, ou seja, quanto menor a massa de extrato utilizado maior a EE. Como tal, selecionou-se o lote 1 de NPs de BSA com 10 mg de extrato de Aramé encapsulado como o mais promissor (Tabela 7).

As formulações preparadas foram adicionalmente liofilizadas e, como forma de verificar que as NPs mantinham as suas características após liofilização, determinou-se o tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das mesmas.

Tabela 8 - Valores médios de tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta das NPs vazias e NPs Aramé após a sua liofilização, com o respetivo desvio padrão.

	V _{NPs BSA} (µL)	Tamanho (nm)	Índice Polidispersão	Potencial Zeta (mV)
NPs Vazias	25	73 ± 30	0,270 ± 0,043	-4,9 ± 0,6
NPs Aramé	25	92 ± 33	0,347 ± 0,152	-8,0 ± 1,3

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Observa-se a partir da Tabela 8 que, após a liofilização, as NPs demonstram ter um menor tamanho associado, bem como um menor índice de polidispersão. Tal pode significar que a liofilização promoveu uma menor agregação das partículas e, conseqüentemente, um menor tamanho médio associado, o que segundo o que foi referido anteriormente é algo favorável. Em relação ao rendimento de produção das NPs Aramé este foi de 70 %. Como tal, reuniram-se todas as condições para nos ensaios de avaliação das propriedades biológicas serem utilizadas as NPs liofilizadas.

4.5. Atividades Biológicas das NPs de BSA

Determinou-se a bioatividade das NPs vazias e NPs Aramé, como forma de perceber se as suas propriedades seriam alteradas relativamente às atividades determinadas para o extrato de Aramé reportadas anteriormente.

4.5.1. Atividade Antioxidante das NPs de BSA

Para determinar a atividade antioxidante das NPs de BSA em estudo recorreu-se ao método do DPPH, tendo como base o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.8. As NPs vazias, não apresentaram atividade antioxidante, para uma concentração de 0,25 mg/mL.

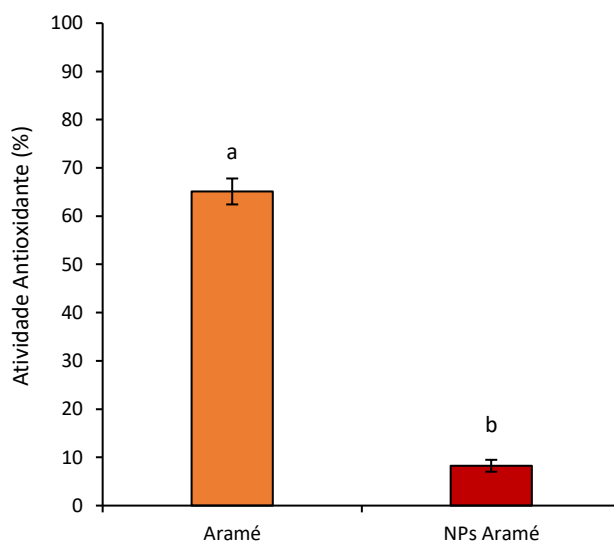


Figura 40 - Atividade antioxidante do extrato de Aramé e das NPs Aramé, para uma concentração de 0,25 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Como se pode observar na Figura 40, para a mesma concentração, o extrato de Aramé apresentou maior atividade antioxidante (65 ± 3 %) que as NPs Aramé (8 ± 1 %). Esta diminuição de atividade antioxidante após encapsulamento pode dever-se ao facto de os compostos presentes no extrato responsáveis pela atividade antioxidante fiquem pouco expostos à superfície das NPs [240] ou até devido a interações com a proteína BSA das NPs [241], tornando-se pouco disponíveis para a redução do radical DPPH durante o tempo do ensaio. Tal não significa que seja uma desvantagem, pois irá permitir que as NPs protejam os compostos com atividade antioxidante no seu interior, sejam

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

ingeridas e digeridas e, enquanto a proteína BSA é degradada, os compostos com atividade antioxidante não o são, acabando por ser mais facilmente absorvidos no local alvo pretendido [242].

4.5.2. Inibição da AChE pelas NPs de BSA

Para estudar a atividade da acetilcolinesterase e a sua posterior inibição recorreu-se à reação de Ellman, tendo como base o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.9.

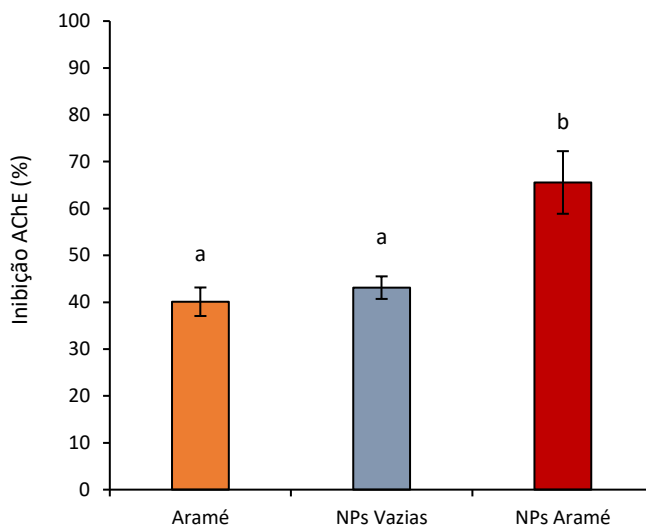


Figura 41 - Inibição da AChE para o extrato de Aramé, NPs vazias e NPs Aramé, para uma concentração de 3 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

A partir dos resultados da Figura 41 foi possível concluir que as NPs vazias têm a capacidade de inibir a enzima AChE, tal pode ser atribuído aos péptidos presentes na albumina [243]. As NPs Aramé apresentaram uma maior inibição da enzima AChE quando comparando com o extrato de Aramé livre e com as NPs vazias. A literatura sugere que a encapsulação em NPs aumenta a eficácia sobre o composto livre, adicionalmente, caso as NPs permeiem bem a barreira intestinal poderão atuar ao nível do cérebro com maior eficiência e melhorar a motilidade gastrointestinal na toma [244].

Como tal, a utilização de NPs Aramé demonstrou ser a melhor opção no que respeita à capacidade de inibição da enzima AChE e, conseqüentemente, na prevenção e diminuição da progressão de doenças neurodegenerativas.

4.5.3. Inibição da HMGR pelas NPs de BSA

Para estudar a atividade da HMGR e a sua posterior inibição recorreu-se ao Kit da Sigma-Aldrich, tendo como base o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.10.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

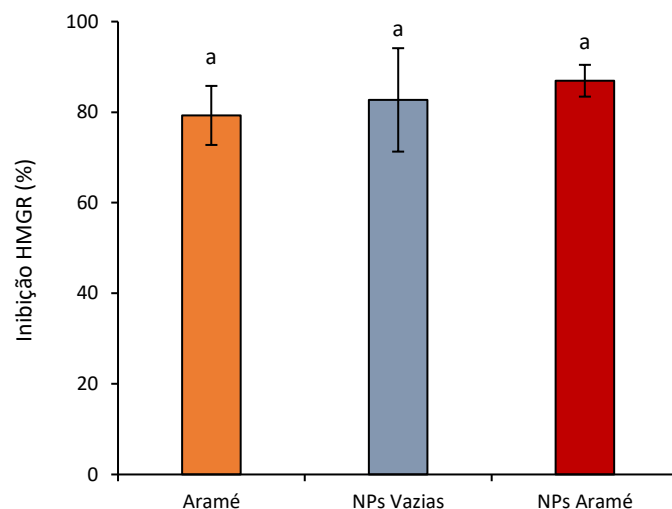


Figura 42 - Inibição da HMGR para o extrato de Aramé, NPs vazias e NPs Aramé, para uma concentração de 0,25 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

A partir dos resultados presentes na Figura 42 foi possível concluir que as NPs vazias têm a capacidade de inibir a enzima HMGR. As NPs Aramé apresentaram um igual valor de inibição da enzima HMGR, quando comparando com o extrato de Aramé livre e com as NPs vazias.

Como tal, a utilização do extrato de Aramé livre ou de NPs Aramé demonstraram ser duas boas opções no que respeita à capacidade de inibição da enzima HMGR e, conseqüentemente, na prevenção e diminuição do risco de CVDs.

4.5.4. Redução na Permeação do Colesterol das NPs de BSA *in vitro*

À semelhança do que se fez para o extrato de Aramé foi feita a mesma determinação para as formulações de NPs vazias e NPs Aramé preparadas.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

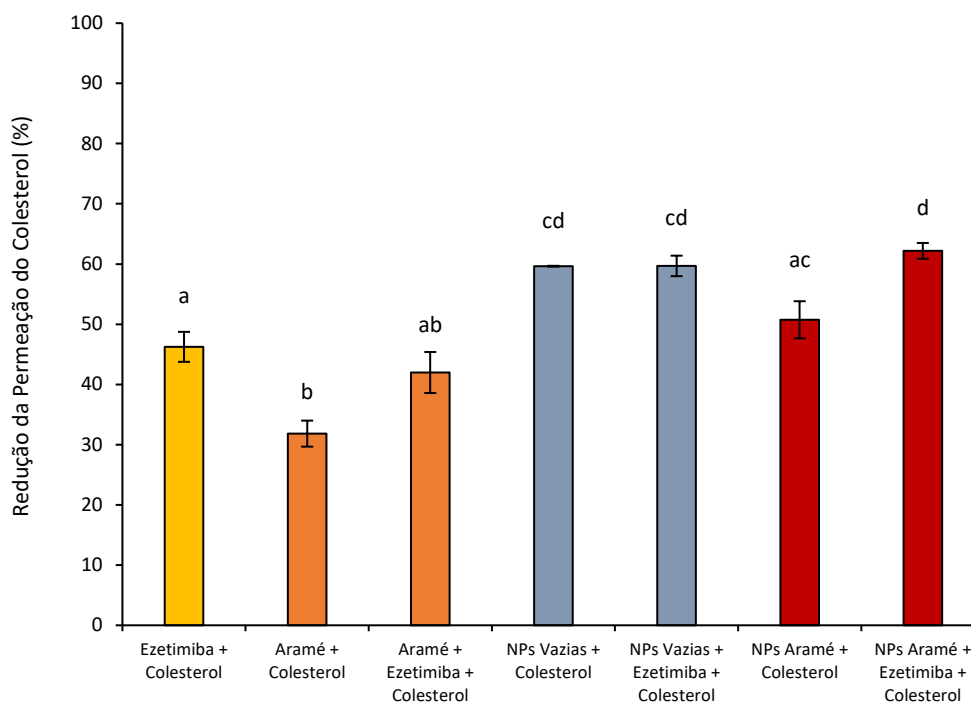


Figura 43 - Redução da permeação do colesterol para a ezetimiba, extrato de Aramé, NPs vazias e NPs Aramé, tendo a solução de colesterol como o 100% da permeação, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

A partir dos resultados da Figura 43 foi possível concluir que tanto as NPs vazias como as NPs Aramé apresentaram uma maior redução na permeação do colesterol quando comparando com o extrato de Aramé livre. Como tal, as NPs de BSA promoveram uma maior acessibilidade ao transportador NPCL1, o que pode possivelmente significar que as NPs se ligam aos compostos presentes no extrato de Aramé. Tal pode ser vantajoso uma vez que fornecem a proteína que os extratos não possuem, servindo de complemento. As proteínas são particularmente importantes para a população envelhecida, que muitas vezes já apresenta deficiências na sua alimentação.

Ao se utilizar as NPs Aramé com ezetimiba, NPs Aramé e NPs vazias com ezetimiba, verificou-se um aumento de eficiência na redução da permeação do colesterol, quando comparando com a utilização do fármaco ezetimiba por si só.

Tendo em conta os resultados obtidos, a opção que demonstrou ser mais favorável na redução da permeação do colesterol, quando o objetivo é a monoterapia, foi a utilização das NPs Aramé. Tendo em vista a terapia combinada, a opção que demonstrou ser a mais favorável foi a utilização das NPs Aramé com ezetimiba. Ambas as opções demonstraram ser mais eficientes do que a monoterapia com o recurso ao fármaco ezetimiba.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Posteriormente, foi avaliada a permeação das NPs Aramé, com o objetivo de se poder verificar se, caso se dê o caso do consumo destas, estas conseguem permear a barreira gastrointestinal e poder comparar com a permeação do extrato livre.

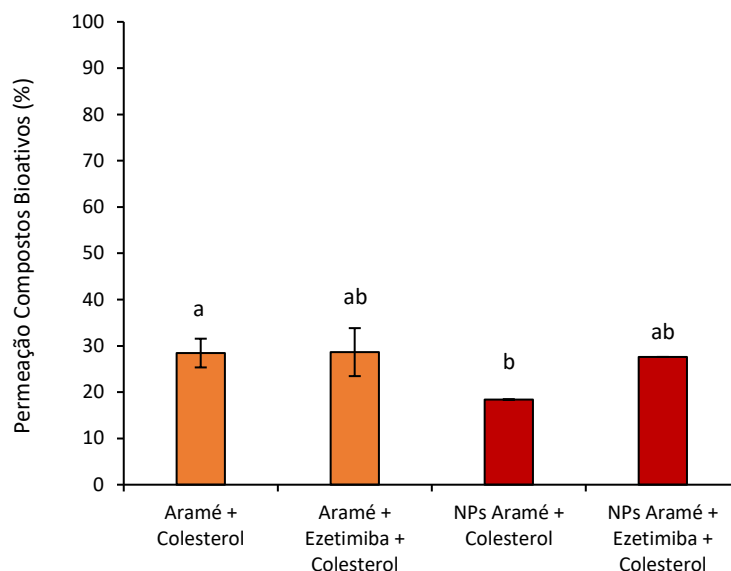


Figura 44 - Permeação dos compostos bioativos do extrato de Aramé e das NPs Aramé, tendo a solução do basolateral do extrato de Aramé e NPs Aramé sem colesterol como o 100% de permeação, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

A partir dos resultados presentes na Figura 44 foi possível concluir que os compostos bioativos presentes nas NPs Aramé foram capazes de atravessar a barreira gastrointestinal quando na presença de colesterol e ezetimiba. No entanto, a capacidade de permeação das NPs não demonstrou ser melhorada comparativamente ao extrato livre.

4.5.5. Ensaio de Segurança das NPs de BSA *in vitro*

Para determinar a citotoxicidade das NPs de BSA em estudo recorreu-se ao método do MTT, tendo como base o procedimento descrito anteriormente no ponto 3.7. Os resultados mostraram que as NPs preparadas tal como o extrato de Aramé apresentaram uma viabilidade celular maior que 80% nas células HepG2 e Caco-2. Como tal, para a concentração de 1 mg/mL, as NPs não demonstraram atividade citotóxica e, portanto, são consideradas seguras para consumo.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

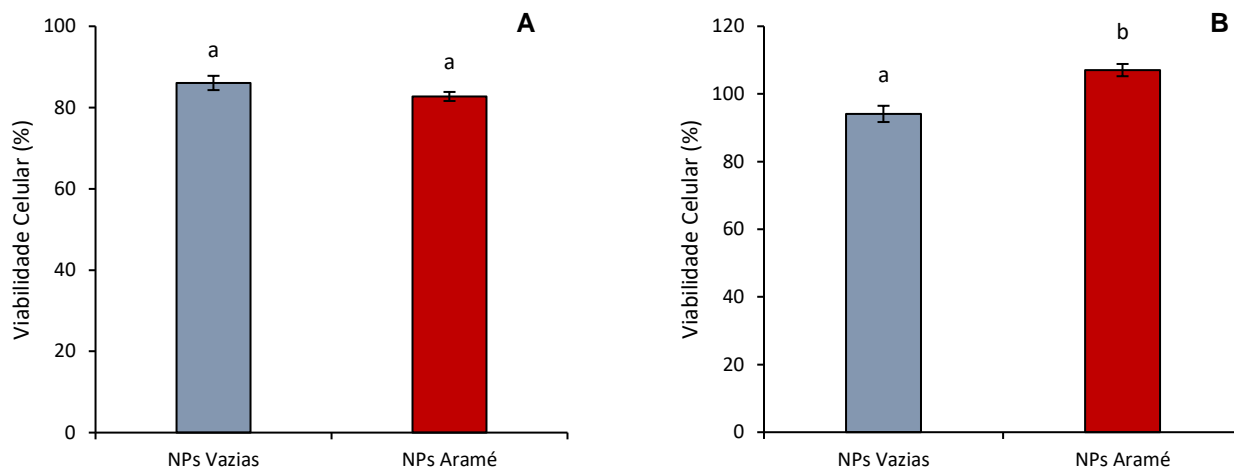


Figura 45 - Viabilidade celular das (A) Caco-2 e (B) HepG2, quando colocadas em contato com NPs vazias e NPs Aramé, para a concentração de 1 mg/mL, com o respetivo desvio. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

A partir da Figura 45 A, referente às células Caco-2, foi possível concluir que as NPs de BSA apresentaram uma menor viabilidade celular (aproximadamente 80 %), não sendo ainda assim consideradas citotóxicas.

No que respeita às células HepG2, foi possível observar na Figura 45 B que as NPs de Aramé demonstraram ter uma viabilidade celular acima dos 100 %, como tal não demonstraram apresentar morte celular e, pelo contrário, as células cresceram mais na sua presença, quando comparando com as células de controlo.

Pode-se assim concluir que estas formulações demonstraram ser seguras para serem usadas nos ensaios de eficácia e segurança *in vivo*, visto não apresentaram citotoxicidade associada para nenhuma das duas linhas celulares em estudo.

4.5.6. Ensaios de Eficácia e Segurança do Extrato de Aramé e NPs de BSA *in vivo*

Após os resultados da segurança *in vitro* em linhas celulares humanas, foi avaliada a segurança e eficácia do extrato de Aramé livre em ratos Wistar após administração oral através da água de bebida e durante um período de 5 semanas, de forma única e diária. Numa primeira fase, o ensaio *in vivo* foi realizado com 12 animais divididos em 4 grupos: grupo 1, controlo negativo onde foi administrada apenas água ($n=2$); grupo 2, controlo positivo onde foi administrada ezetimiba pura (0,1 mg/mL) ($n=3$); grupo 3, teste 1 com o extrato de Aramé em estudo (0,1 mg/mL) ($n=4$); e grupo 4, teste 2 com uma mistura de ezetimiba pura e extrato de Aramé (0,1 mg/mL) ($n=3$). O peso dos animais, glicémia, ração consumida e parâmetros de urina foram verificados semanalmente. A taxa de mortalidade foi igualmente avaliada.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Inicialmente observou-se que a concentração do colesterol plasmático dos ratos foi de 40 mg/mL, valor esse concordante com os valores de referências descritos na literatura [245]. Na urina observou-se que todos os parâmetros analisados (Tabela Anexo 1) não sofreram alterações após administração do extrato livre ou da ezetimiba. No que se refere à ração consumida não houve diferenças na primeira, segunda e quarta semanas de ensaio. As únicas diferenças surgiram na terceira e quinta semanas, sendo mais significativas nesta última.

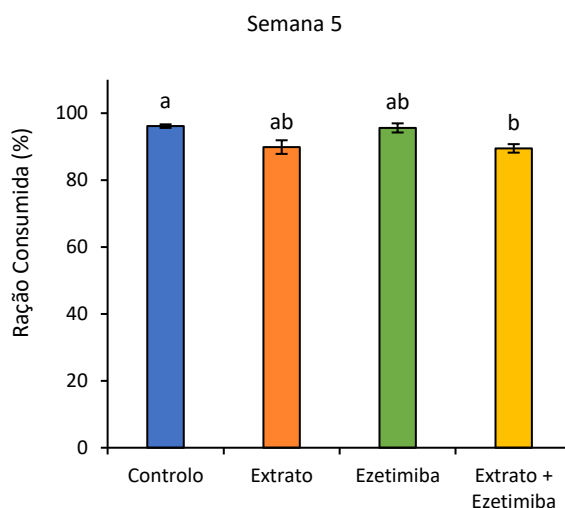


Figura 46 - Variação da ração consumida para cada grupo de teste. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Na terceira semana (Figura Anexo 12), os ratos pertencentes ao grupo do extrato consumiram uma menor quantidade de ração quando comparando com os ratos do controlo. Tal pode significar que o extrato provoca uma diminuição do apetite. No que respeita à Figura 46, os ratos que consumiram extrato com ezetimiba, demonstraram consumir uma menor quantidade de ração, quando comparando com o controlo. Podendo dever-se mais uma vez ao facto de o extrato provocar a diminuição do apetite, visto que as alterações de ração consumida se verificaram apenas para os grupos que consumiram extrato na bebida.

Quanto ao peso, não se observou a alteração do mesmo ao longo das 5 semanas de ensaio, sendo a Figura 47 a representação da quinta semana de ensaio. No caso da glicémia não se verificou uma diferença significativa na primeira, segunda e quarta semanas de ensaio. As únicas diferenças surgiram na terceira e quinta semanas.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

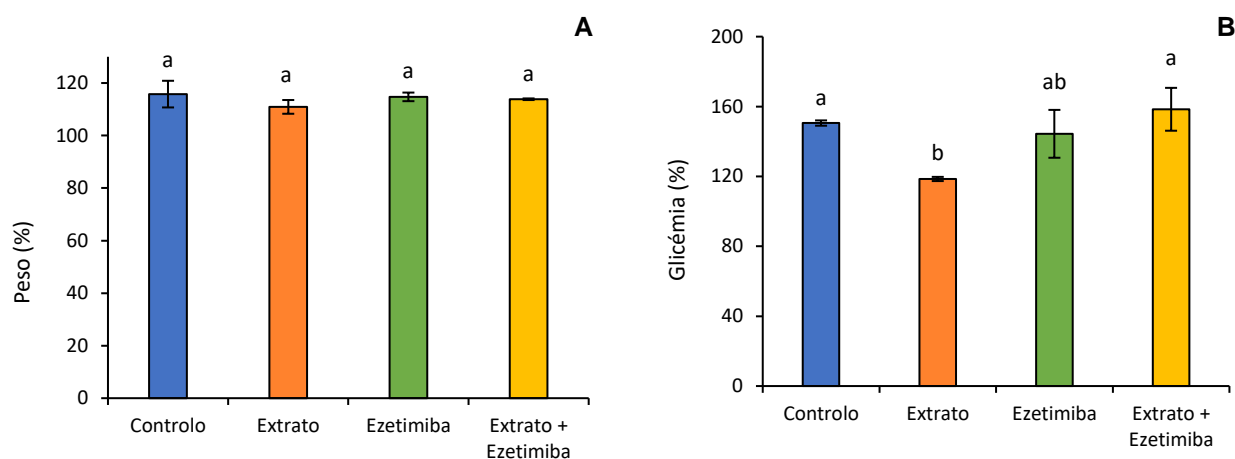


Figura 47 - Variação do (A) peso e (B) glicémia para cada grupo de teste na quinta semana de ensaio. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

A não alteração do peso, durante as 5 semanas de ensaio, observada pela Figura 47 A, pode dever-se ao facto de o extrato não ser rico em proteínas [246] e pelo facto de as algas geralmente apresentarem um baixo teor lipídico [247].

Na terceira semana (Figura Anexo 13), o grupo de teste correspondente à ezetimiba apresentou um menor valor de glicémia, quando comparando com o grupo de controlo. Esta diminuição é concordante com o que é descrito na literatura em que foi comprovada a capacidade da ezetimiba em baixar a glicémia [248]. No entanto, observando a Figura 47 B, no que respeita à quinta semana, verificou-se uma maior redução da glicémia para o grupo de ratos que consumiu o extrato. Tal pode dever-se a este ter sido o dia do sacrifício, pois os ratos pertencentes ao grupo do extrato aparentavam encontrar-se mais calmos, quando comparando aos ratos dos restantes grupos e o stress aumenta a glicémia [249].

Como forma de determinar a influência da administração de extrato, ezetimiba e mistura de extrato e ezetimiba nos níveis de colesterol e função renal dos ratos Wistar, determinaram-se as concentrações de colesterol e ureia para os diferentes grupos de ratos em estudo.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

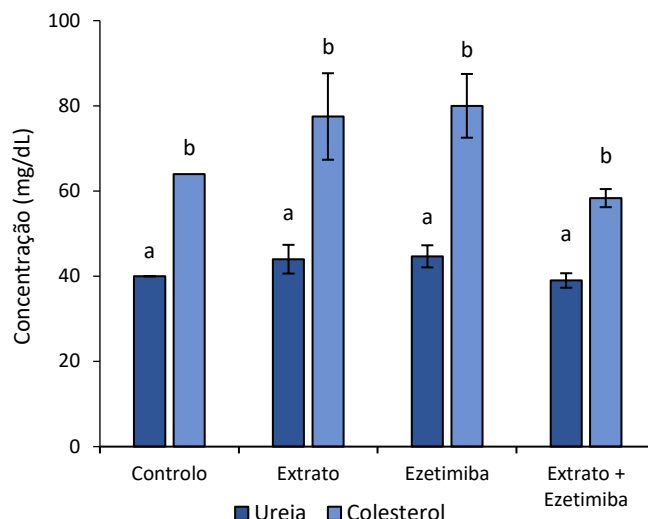


Figura 48 - Valores de colesterol e ureia obtidos para os diferentes grupos de ratos, após 5 semanas de ensaio. Os valores encontram-se representados como média \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

A partir da Figura 48 foi possível observar que os valores de colesterol obtidos para cada grupo não apresentaram uma diferença significativa entre si. Como tal, pode assumir-se que este ensaio não foi conclusivo, visto que alguns dos ratos não consumiram, quando disponibilizado livremente, a água contendo o extrato, a ezetimiba e a mistura de ambos. O que pode ter contribuído para tal pode ser o facto de os ratos não terem gostado do cheiro e/ou sabor do extrato. Também se pode dever ao facto de se ter apenas determinado o colesterol final total, e não o HDL-C e LDL-C especificamente, podendo ter ocorrido um aumento do HDL-C e diminuição do LDL-C para algum dos grupos e o colesterol final total não demonstrar ter uma redução significativa. Uma outra razão, que pode ser a mais relevante, é o facto de os ratos não serem hipercolesterolémicos. Tal pode ter contribuído para que os resultados finais de colesterol não tenham sido muito expressivos, pois a diminuição de colesterol nunca poderia ter sido muito elevada.

Quando comparando os resultados obtidos com a bibliografia não se encontraram resultados para o extrato de Aramé. No entanto observou-se para a alga castanha *Himanthalia elongata* uma diminuição do colesterol total (28 %) e um aumento do HDL-C (20 %) [250].

A partir da Figura 48 foi ainda possível concluir que os valores de ureia obtidos não demonstraram ser significativamente diferentes. Sendo que, os valores obtidos vão de encontro aos esperados no que respeita a ratos Wistar com um normal metabolismo, mais especificamente função renal [251]. Como tal concluiu-se que a administração do extrato, ezetimiba e a mistura de ambos não comprometeu a função renal dos ratos em estudo.

Finalmente, os índices tecidulares foram determinados e os resultados encontram-se descritos na Tabela 9.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Tabela 9 - Índice tecidual do fígado, rim e baço para cada grupo de teste. Os valores encontram-se representados como média \pm SEM.

Grupo	Índice Tecidual		
	Fígado	Rim	Baço
Controlo	19,04 \pm 0,13	6,10 \pm 0,07	4,56 \pm 0,02
Extrato	18,67 \pm 0,17	5,47 \pm 0,10	4,17 \pm 0,09
Ezetimiba	18,59 \pm 0,10	5,37 \pm 0,06	3,92 \pm 0,09
Extrato + Ezetimiba	18,86 \pm 0,19	5,65 \pm 0,10	3,96 \pm 0,04

A partir da Tabela 9 foi possível observar que os órgãos internos dos ratos de controlo não apresentaram um valor de índice tecidual significativamente diferente quando comparando com os restantes grupos de estudo, bem como quando comparando os grupos em que se administrou extrato, ezetimiba e a mistura de ambos, entre si. Como tal concluiu-se que a administração do extrato de Aramé livre, ezetimiba e a administração de ambos é segura no que respeita ao normal funcionamento dos órgãos.

Numa segunda fase, procedeu-se à avaliação da segurança e eficácia das NPs de BSA com extrato de Aramé em 20 ratos Wistar machos através de administração oral diária (5 dias por semana, por 4 semanas), por gavagem. Para tal dividiram-se os ratos em 4 grupos: grupo 1, controlo negativo onde foi administrada apenas água (n=5); grupo 2, teste 1 com o extrato livre de Aramé (1 mg/mL) (n=5); grupo 3, teste 2 com uma mistura de ezetimiba pura e extrato livre de Aramé (1 mg/mL) (n=5); e grupo 4, teste 3 com NPs de BSA com extrato de Aramé (11,1 mg/mL) (n=5).

Neste ensaio não se efetuou uma avaliação semanal dos elementos presentes na urina de cada rato, mas uma amostragem aleatória, no que respeita à urina dos ratos dos diferentes grupos, e concluiu-se que não houve uma alteração significativa dos diferentes parâmetros, quando comparando com o grupo de controlo.

Diferente do ensaio anterior, a ração adicionada para cada rato não foi contabilizada, mas sim a ração adicionada para cada grupo, como tal apenas foi possível perceber a variação média da ração consumida ao longo das semanas de ensaio para cada grupo.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

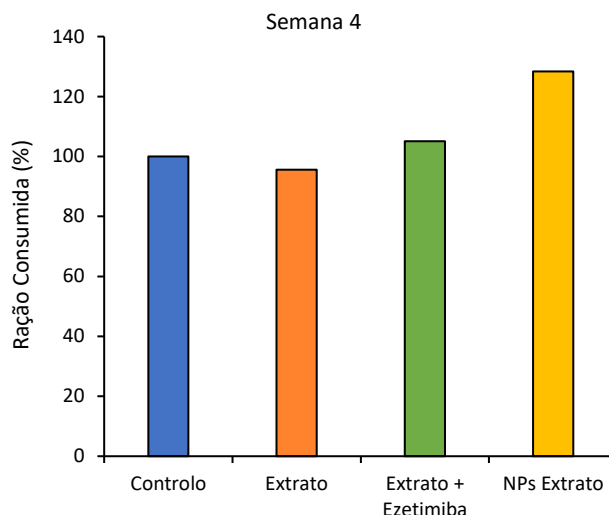


Figura 49 - Variação da ração consumida para cada grupo de teste. Os valores encontram-se representados pela média.

Tendo em conta a Figura 49, depreendeu-se que os ratos sujeitos à administração das NPs extrato demonstraram consumir uma maior quantidade de ração ao longo do ensaio, seguidos dos ratos que consumiram em simultâneo o extrato e ezetimiba, dos ratos do grupo de controlo e dos ratos que consumiram apenas extrato. Sendo que estes dois últimos grupos demonstraram ter valores mais parecidos de ração consumida ao longo de todo o ensaio.

Em relação ao peso não foram observadas diferenças referentes à segunda, terceira e quarta semanas de ensaio. No que respeita à glicémia apenas se verificaram diferenças na primeira e segunda semana. Tal pode dever-se ao facto de ser o início do ensaio e os animais estarem mais stressados, obtendo-se assim valores de glicémia mais elevados [249].

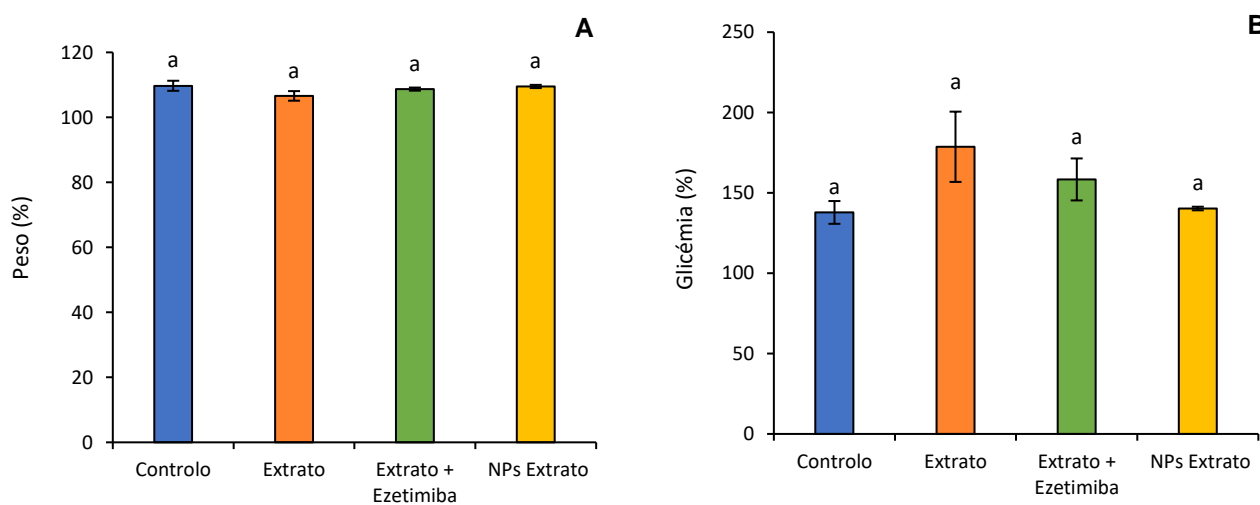


Figura 50 - Variação do (A) peso e (B) glicémia para cada grupo de teste na quarta semana. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Pela Figura Anexo 14, observou-se que os ratos que consumiram extrato, extrato com ezetimiba e NPs extrato, apresentaram um menor peso quando comparando com o grupo de controlo. No entanto, pela Figura 50 A não se observou uma variação significativa de peso entre grupos de estudo.

A partir da Figura Anexo 15 A foi possível observar que na primeira semana os valores de glicémia obtidos para os ratos que consumiram extrato foram significativamente diferentes aos obtidos para os que consumiram NPs com extrato, obtendo-se um menor valor de glicémia para este último. Pela Figura Anexo 15 B, obtiveram-se valores de glicémia significativamente diferentes quando comparando os ratos que consumiram extrato com os que consumiram extrato com ezetimiba, tendo-se uma redução do valor de glicémia para este último. No entanto, pela Figura 50 B não se observou variação de glicémia entre grupos de estudo. Estes valores de glicémia podem dever-se ao facto de os ratos em estudo serem ratos normais, não hipercolesterolémicos e sem problemas a nível metabólico, como tal realizam a homeostase normal e repõem os níveis de glicémia ao longo das semanas.

Como forma de determinar a influência da administração de extrato, mistura de extrato e ezetimiba e NPs extrato nos níveis de colesterol e função renal dos ratos Wistar, determinaram-se as concentrações de colesterol e ureia para os diferentes grupos de ratos em estudo.

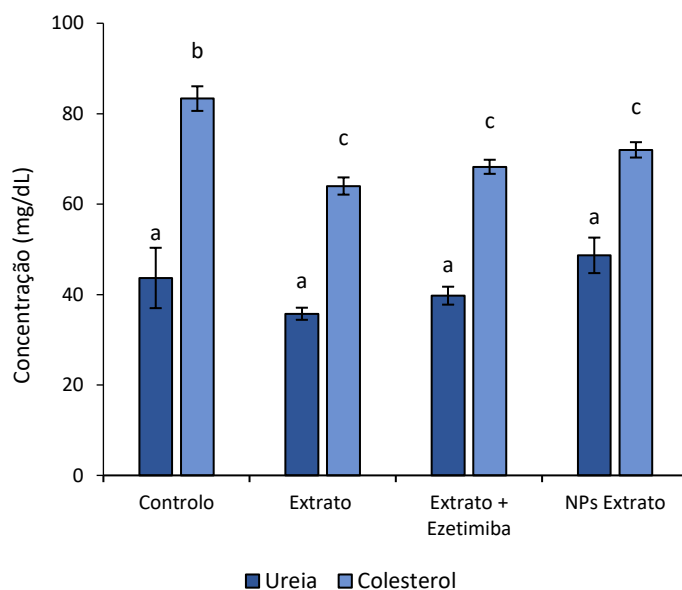


Figura 51 - Valores de colesterol e ureia obtidos para os diferentes grupos de ratos, após 4 semanas de ensaio. Os valores encontram-se representados como média \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Os valores de colesterol obtidos para os diferentes grupos em estudo foram ligeiramente diferentes aos obtidos para o grupo de controlo (Figura 51). Observou-se que o extrato livre, o extrato com ezetimiba e as NPs extrato demonstraram ter a capacidade de reduzir o colesterol em ensaios *in vivo*. No entanto, esta diminuição do colesterol não demonstrou ser expressiva entre grupos, podendo ter havido um aumento do HDL-C e diminuição do LDL-C para algum dos grupos, e o colesterol

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

final total ser semelhante entre estes. Uma outra razão pode ser o facto de os ratos não serem hipercolesterolémicos. Tal pode ter contribuído para que os resultados finais de colesterol não tenham sido muito expressivos, pois a diminuição de colesterol nunca poderia ter sido muito elevada. No entanto, estes resultados de colesterol final obtidos para o extrato, mistura de extrato e ezetimiba e NPs extrato, encontram-se concordantes com os resultados já obtidos *in vitro* para o ensaio de redução de permeação de colesterol utilizando a linha celular Caco-2 (ponto 4.5.4.).

Quando comparando os resultados obtidos com a bibliografia não se encontraram estudos em que se tenha determinado a concentração de colesterol final após administração de NPs de BSA com extrato de Aramé encapsulado em ensaios *in vivo*, nem da encapsulação de outras algas ou produtos naturais e como tal os resultados obtidos apresentam inovação.

A partir da Figura 51 foi ainda possível concluir que os valores de ureia obtidos não demonstraram ser diferentes entre grupos. Sendo que, os valores obtidos vão de encontro aos esperados no que respeita a ratos Wistar com um normal metabolismo, mais especificamente função renal [251]. Como tal concluiu-se que a administração do extrato, mistura de extrato e ezetimiba e NPs extrato não comprometeu a função renal dos ratos em estudo.

Para avaliar e comparar a toxicidade das metodologias testadas determinou-se o índice tecidual dos órgãos recolhidos, os resultados encontram-se descritos Tabela 10.

Tabela 10 - Índice tecidual do fígado, rim e baço para cada grupo de teste. Os valores encontram-se representados como média \pm SEM.

Grupo	Índice tecidual		
	Fígado	Rim	Baço
Controlo	17,53 \pm 0,29	5,70 \pm 0,08	4,27 \pm 0,08
Extrato	16,65 \pm 0,23	5,53 \pm 0,04	4,01 \pm 0,13
Extrato + Ezetimiba	16,47 \pm 0,37	5,61 \pm 0,10	4,01 \pm 0,04
NPs Extrato	16,92 \pm 0,37	5,42 \pm 0,11	4,36 \pm 0,15

Foi possível observar que os órgãos internos dos ratos de controlo não apresentaram uma diferença significativa de índice tecidual quando comparando com os restantes grupos de estudo, bem como quando comparando os grupos em que se administrou extrato, extrato e ezetimiba e NPs extrato, entre si.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Por fim, realizou-se a avaliação histológica dos órgãos excisados.

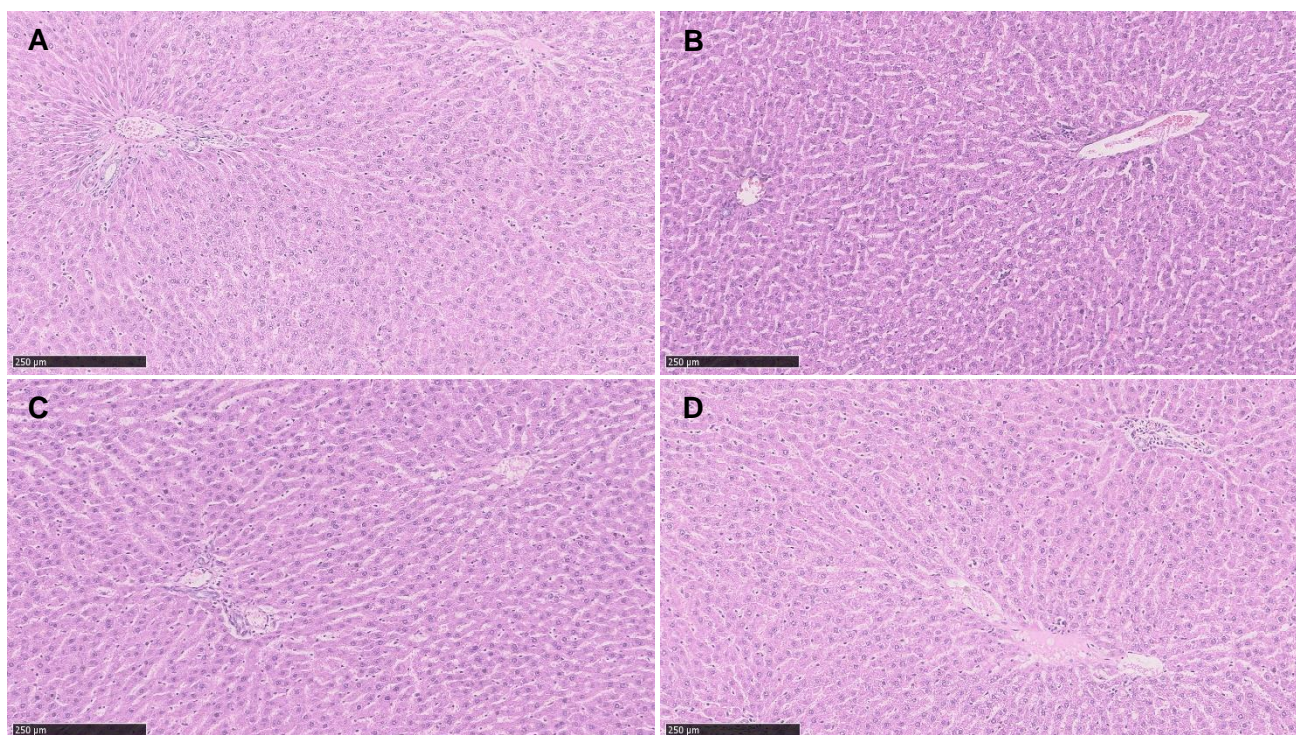


Figura 52 - Representação histológica do (A) fígado do grupo de controlo, (B) fígado do grupo em que se administrou extrato de Aramé, (C) fígado do grupo em que se administrou ezetimiba e extrato de Aramé e (D) fígado do grupo em que se administrou NPs de BSA com extrato de Aramé.

A partir da Figura 52, foi possível concluir que apenas o fígado do rato do grupo de controlo (1 animal em 5), apresentou um ligeiro infiltrado linfoplasmocitário periportal, não se verificando alterações significativas para os restantes grupos.

Como tal foi possível afirmar que a administração de extrato, extrato com ezetimiba e NPs extrato não demonstrou alterar a histológica do fígado dos grupos em estudo.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

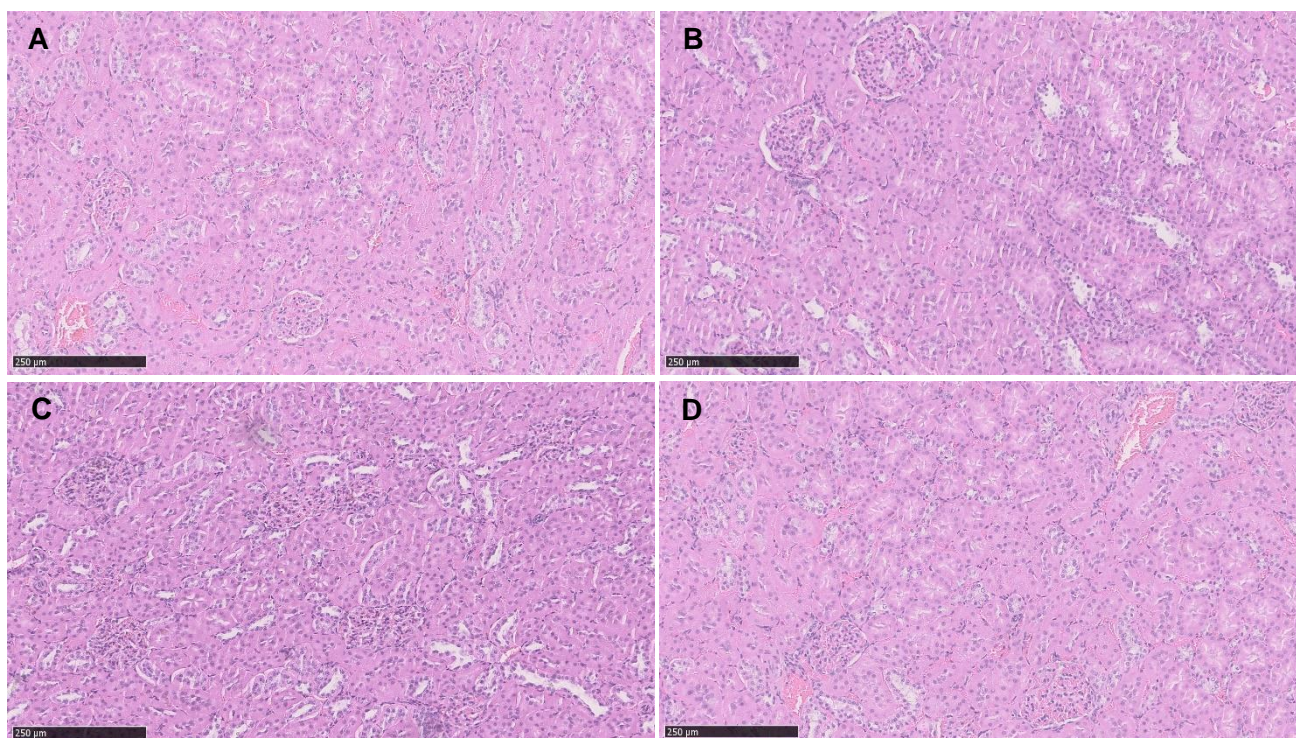


Figura 53 - Representação histológica do (A) rim do grupo de controlo, (B) rim do grupo em que se administrou extrato de Aramé, (C) rim do grupo em que se administrou ezetimiba e extrato de Aramé e (D) rim do grupo em que se administrou NPs de BSA com extrato de Aramé.

Pela Figura 53 foi possível concluir que apenas o rim do rato do grupo em que se administrou extrato com ezetimiba (1 animal em 5), apresentou um ligeiro infiltrado linfoplasmocitário intersticial, o que pode indiciar um processo inflamatório pouco relevante que não se verificou nos restantes grupos.

Como tal foi possível concluir que a administração de extrato, extrato com ezetimiba e NPs extrato, numa elevada concentração, não demonstrou alterar a histológica do rim dos grupos em estudo de uma forma significativa.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

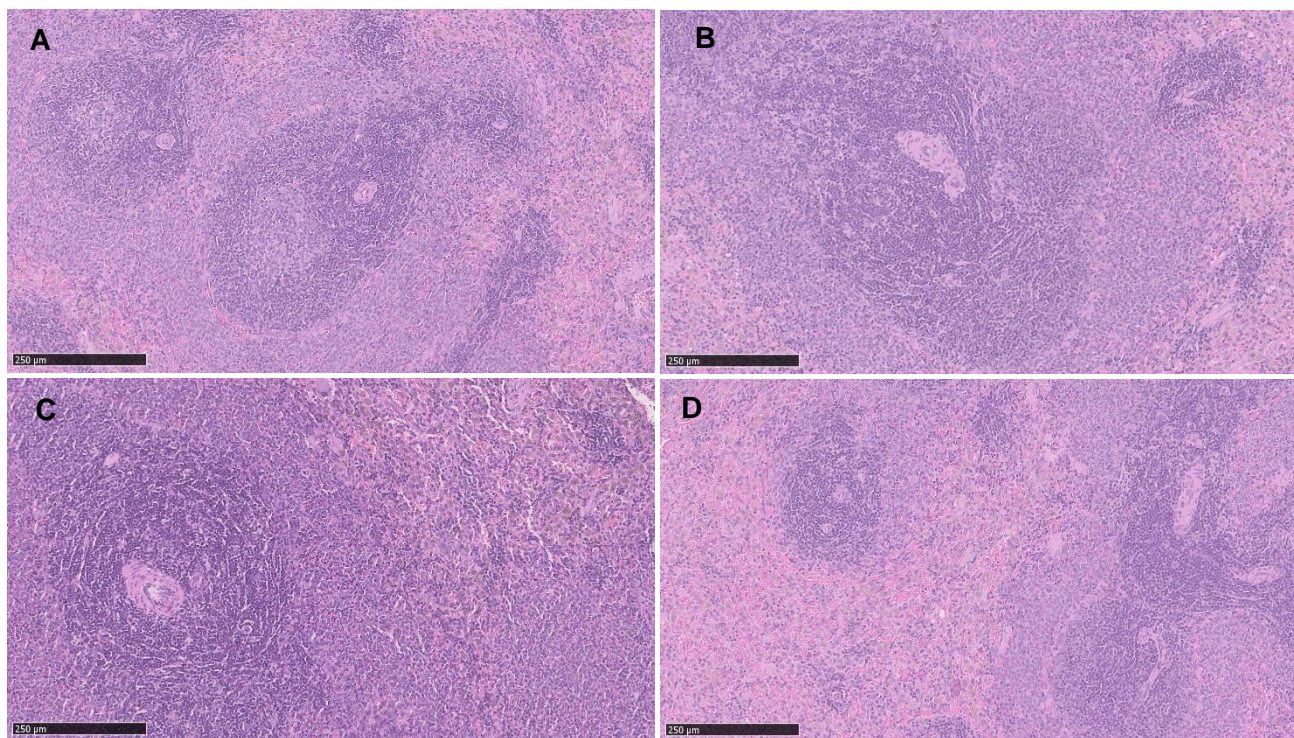


Figura 54 - Representação histológica do (A) baço do grupo de controlo, (B) baço do grupo em que se administrou extrato de Aramé, (C) baço do grupo em que se administrou ezetimiba e extrato de Aramé e (D) baço do grupo em que se administrou NPs de BSA com extrato de Aramé.

Quando observando a Figura 54 foi possível concluir que não se verificou uma alteração significativa do baço em nenhum dos grupos de estudo. Como tal concluiu-se que a administração de extrato, extrato com ezetimiba e NPs extrato, numa elevada concentração, não demonstrou alterar a morfologia do baço dos grupos em estudo.

A partir da determinação do índice tecidular e análise histológica dos órgãos recolhidos, foi possível concluir que a administração de extrato de Aramé, extrato de Aramé com ezetimiba e NPs com extrato de Aramé demonstrou ser segura no que respeita ao normal funcionamento dos órgãos e organismo dos ratos em estudo. No entanto, estas mesmas amostras podem afetar o metabolismo celular a outros níveis, como tal estas alterações foram avaliadas por uma análise metabolómica do soro dos ratos por LC-QTOF-MS.

4.5.7. Análise do Soro dos Ratos por LC-QTOF-MS

Os resultados obtidos das análises bioquímicas e histológicas nos estudos *in vivo* efetuados foram adicionalmente explorados recorrendo a uma análise das alterações nos metabolitos do soro dos ratos dos diferentes grupos por LC-QTOF-MS e tendo como base o procedimento descrito no ponto 3.17. Os metabolitos presentes no soro dos ratos foram isolados e sujeitos a separação cromatográfica por LC e a sua razão massa/carga (m/z) determinada por espetrometria de massa. Recorrendo às bases de dados disponíveis no software Metaboscape foi ainda possível efetuar uma identificação preliminar de alguns dos metabolitos mais representativos.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Os metabolitos presentes no soro dos ratos controlo foram comparados com os metabolitos detetados no soro dos diferentes grupos de ratos tratados, ou seja, sujeitos à toma de solução de extrato de Aramé (Extrato), solução de NPs com extrato de Aramé (NPs Extrato), solução de Ezetimiba (Ezetimiba) e solução de extrato de Aramé com ezetimiba (Extrato + Ezetimiba). A análise estatística diferencial dos metabolitos entre os grupos de ratos analisados foi efetuada com recurso ao software Metaboscape.

A partir de métodos de redução de dimensionalidade, como a regressão por projeção em estruturas latentes (*PLS-Projection on latent structures*) e a análise de componentes principais (*PCA-Principal Component Analysis*) é possível identificar semelhanças e diferenças entre as amostras a partir do conjunto e das intensidades dos metabolitos existentes nas amostras [252]. No caso da análise por PLS, sendo uma análise estatística supervisionada, onde se associa os metabolitos ao grupo dos ratos onde foram detetados, é possível atribuir uma importância aos metabolitos (Figura 55 A a Figura 58 A no eixo do y) consoante a variação que estes apresentam entre os grupos comparados, tratado e controlo. Neste sentido, os que apresentam maior importância são os que se encontram num grupo e não no outro ou os que quando detetados apresentam diferenças de intensidades entre grupos [253].

A partir das análises por PCA (Figura 55 a Figura 58 C) da totalidade dos metabolitos presentes nos soros dos ratos tratados em comparação com os dos ratos controlo, é possível verificar que as amostras de soro analisadas diferem entre si, mas tendem a agrupar dentro do mesmo grupo de ratos, encontrando-se mais semelhantes entre grupos. Pelos resultados obtidos, em todas as comparações efetuadas (Figura 55 C a Figura 58 C) verificou-se a semelhança entre as amostras analisadas dos soros dos ratos no mesmo grupo, que agrupam entre si sendo mais distantes relativamente aos soros dos ratos controlo que também agrupam entre si. Isto indica que os ratos sujeitos à toma do Extrato, NPs Extrato, Ezetimiba e Extrato + Ezetimiba apresentam diferenças nos metabolitos do soro relativamente aos ratos controlo.

A análise estatística que permite avaliar se a diferença nos metabolitos detetados é significativa entre os grupos comparados é feita por recurso à representação gráfica em Volcano (Figura 55 B a Figura 58 B). A representação gráfica em Volcano relaciona a abundância relativa dos metabolitos presentes entre dois grupos (fold change), no eixo do x, e a significância estatística dessa variação, no eixo do y ($-\log_{10}$ p-value). Neste tipo de figura os metabolitos presentes no soro foram identificados como pontos com o seu valor m/z. Os metabolitos que têm um fold change relativamente baixo, ou seja, não são significativamente diferentes entre os dois grupos em análise, aparecem perto do centro e abaixo da linha limite (metabolitos do soro de cor preta). Os metabolitos que têm p-values significativamente baixos encontram-se na parte superior direita ou esquerda (metabolitos do soro de cor laranja) indicando estarem diferencialmente mais abundantes no grupo da direita relativamente ao grupo da esquerda e vice versa [254].

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

A Figura 55 representa a análise dos metabolitos detetados no soro dos ratos controlo relativamente aos metabolitos detetados no soro dos ratos sujeitos à toma do extrato.

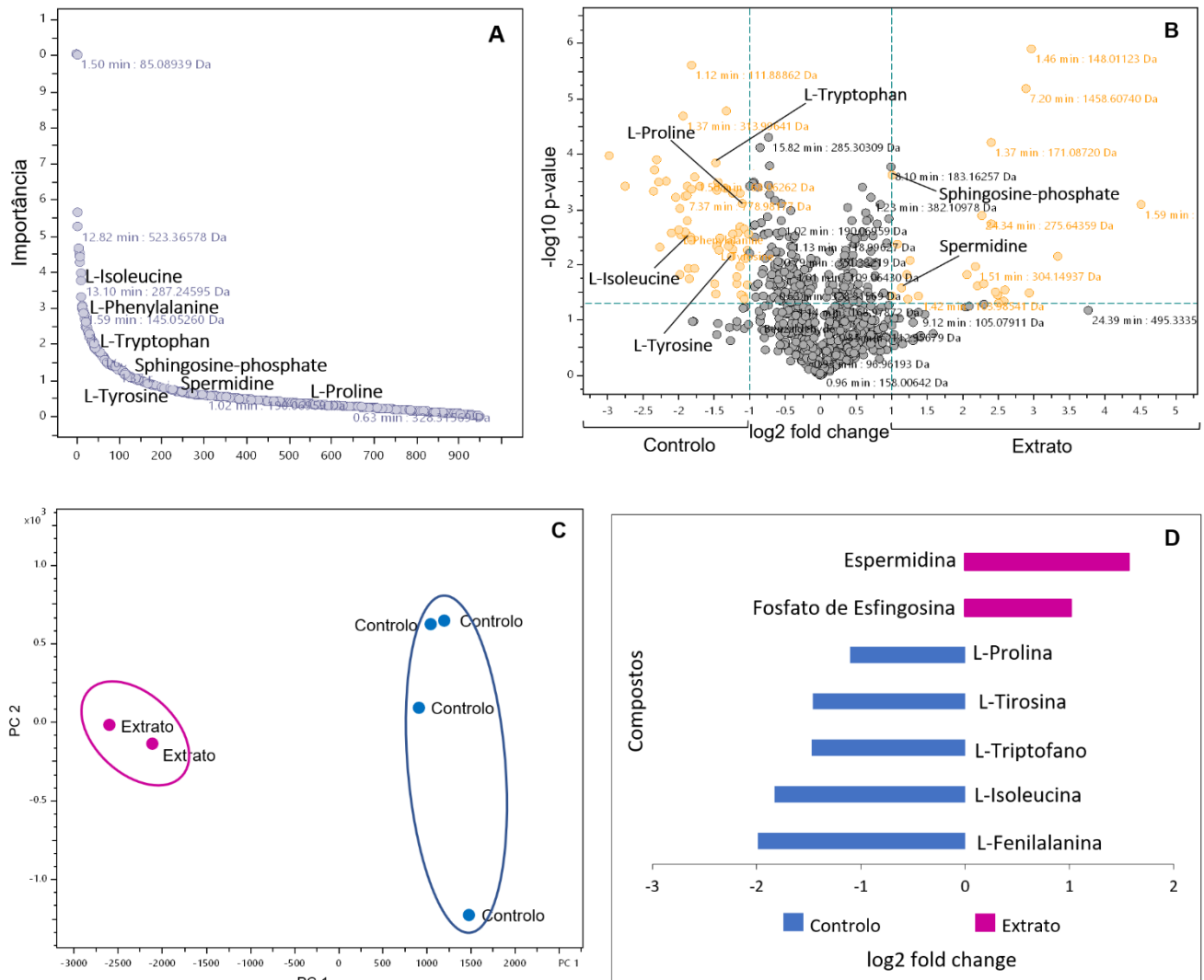


Figura 55 - Representação gráfica: (A) PLS, (B) Volcano, (C) PCA e (D) Compostos identificados, para o soro do rato do controlo e soro do rato em que foi administrado extrato.

A partir da Figura 55 B foi possível dizer que a amostra do controlo apresentou uma maior quantidade de metabolitos que não se encontraram na amostra de extrato que o contrário. Como tal, foi possível concluir que ao se administrar extrato, o soro dos ratos perdeu um maior número de metabolitos do que aqueles que foram formados.

Os compostos identificados presentes na Figura 55 D, são apenas alguns dos possíveis metabolitos que se podem encontrar no soro dos ratos sujeitos à toma do extrato, nomeadamente maior quantidade de espermidina, uma poliamina já identificada na alga Aramé [255], que tem a capacidade de reduzir o colesterol total, LDL-C e aumentar o HDL-C [256] e o fosfato de esfingosina, um aminoácido associado a um grupo fosfato, constituinte dos esfingolípido, que se encontra associado a um aumento do HDL-C [257,258]. O aumento da presença destes metabolitos pode justificar a

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

redução do colesterol observada tanto no ensaio de permeação na barreira gastrointestinal como no ensaio *in vivo* em que se administrou durante 4 semanas o extrato.

No caso dos ratos sujeitos à toma de extrato reduziram no soro, relativamente ao controlo, os aminoácidos L-triptofano, L-isoleucina e L-fenilalanina que são aminoácidos essenciais [259] e outros aminoácidos não essenciais como a L-tirosina e L-prolina, podendo levar a uma redução na síntese de proteínas, hormonas ou neurotransmissores peptídicos em ratos sujeitos à toma do extrato [260].

A Figura 56 representa a análise dos metabolitos detetados no soro dos ratos controlo relativamente aos metabolitos detetados no soro dos ratos sujeitos à toma de NPs extrato.

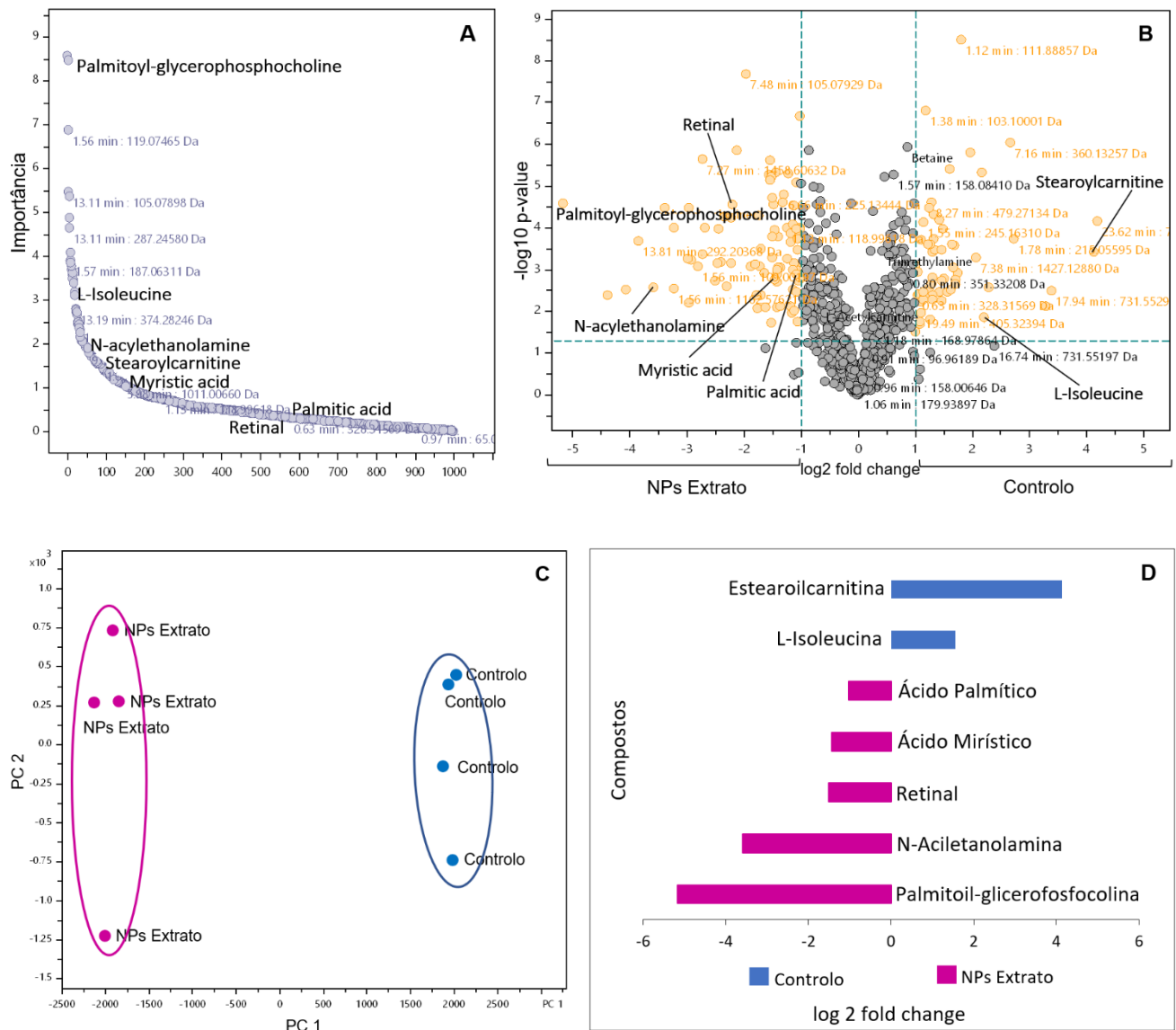


Figura 56 - Representação gráfica: (A) PLS, (B) Volcano, (C) PCA e (D) Compostos identificados, para o soro do rato do controlo e soro do rato em que foi administrado NPs extrato.

A partir da Figura 56 B foi possível dizer que a amostra do controlo apresentou um grande número de metabolitos que não se encontraram no soro dos ratos sujeitos à toma de NPs extrato.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Como tal, foi possível concluir que ao se administrar NPs extrato, o soro dos ratos alterou um grande número de metabolitos.

Os compostos identificados na Figura 56 D são apenas alguns dos possíveis metabolitos que se podem encontrar no soro dos ratos sujeitos à toma de NPs extrato. Verificou-se nos ratos sujeitos à toma das NPs extrato, um aumento de vários lípidos do soro relativamente aos ratos controlo, nomeadamente uma maior quantidade de ácido mirístico, um lípido associado a uma diminuição do HDL-C [261], ácido palmítico, um lípido associado ao aumento do LDL-C [262], N-aciletanolamina, um lípido que se encontra associado à redução do risco de CVDs [263], palmitoil-glicerofosfocolina, um lisofosfolípido associado a uma diminuição do colesterol total e LDL-C e aumento do HDL-C [264] e retinal, um diterpeno associado a fatores de risco cardiovascular [265], quando insuficiente [266]. O aumento da presença de N-aciletanolamina, palmitoil-glicerofosfocolina e retinal pode justificar a redução do colesterol observada tanto no ensaio de permeação na barreira gastrointestinal como no ensaio *in vivo* em que se administrou durante 4 semanas as NPs de extrato.

Em oposição, verificou-se no soro dos ratos sujeitos à toma de NPs extrato, relativamente aos ratos de controlo, uma diminuição de esteroilcarnitina, uma acilcarnitina associada à inibição da lecitina:colesterol aciltransferase (LCAT), enzima responsável pela homeostase do colesterol livre entre tecidos periféricos e partículas HDL [267] e L-isoleucina, um metabolito já encontrado no extrato, que decresceu tanto na toma de extrato como NPs extrato. A diminuição destes metabolitos pode promover a homeostase do colesterol e reduzir a síntese de proteínas, hormonas ou neurotransmissores peptídicos em ratos sujeitos à toma de NPs extrato [260,267].

A Figura 57 representa a análise dos metabolitos detetados no soro dos ratos controlo relativamente aos metabolitos detetados no soro dos ratos sujeitos à toma de ezetimiba.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

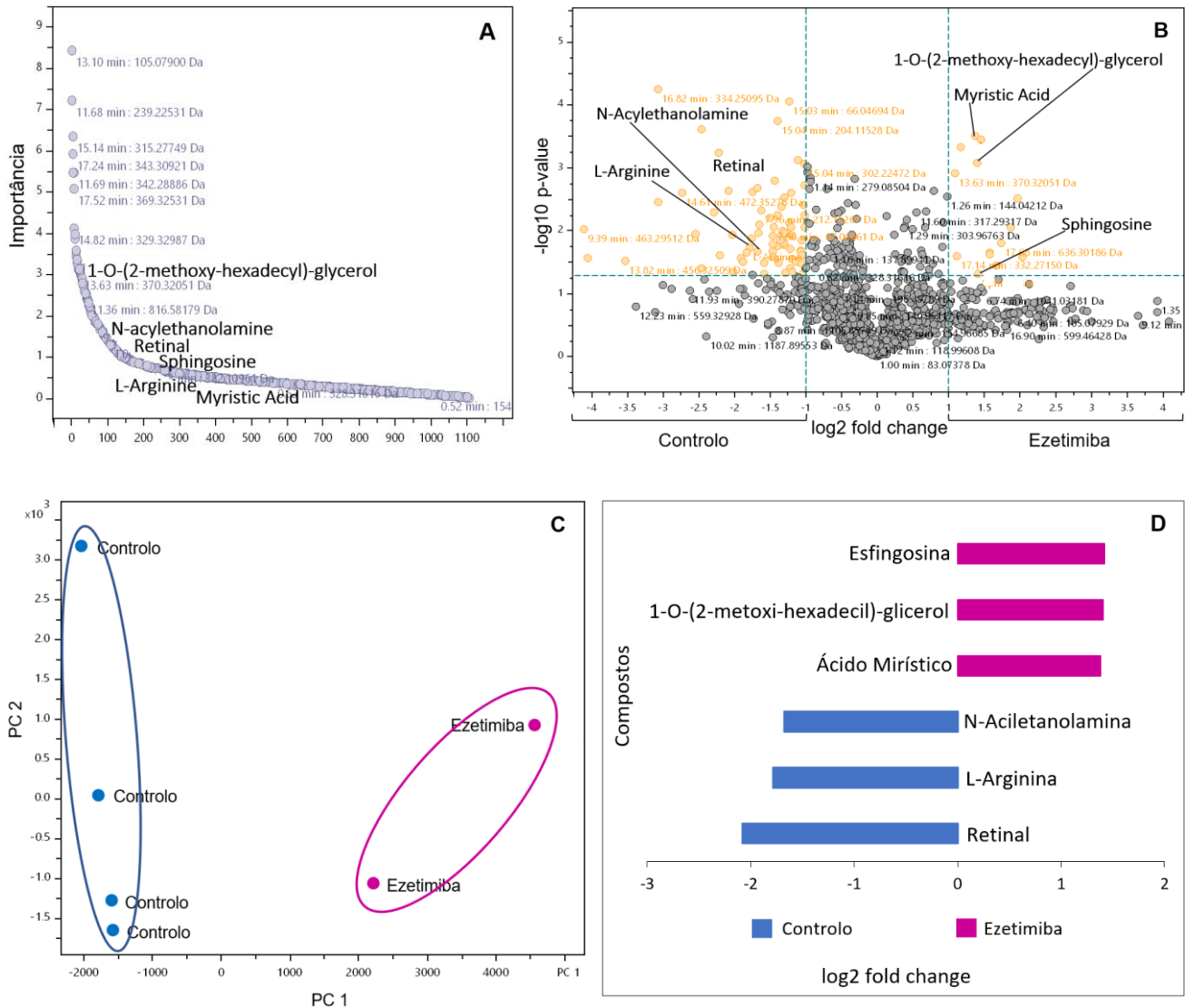


Figura 57 - Representação gráfica: (A) PLS, (B) Volcano, (C) PCA e (D) Compostos identificados, para o soro do rato do controlo e soro do rato em que foi administrado ezetimiba.

A partir da Figura 57 B depreendeu-se que a amostra do controlo apresentou uma maior quantidade de metabolitos que não se encontraram na amostra de ezetimiba que o contrário. Como tal, é possível concluir que ao se administrar ezetimiba o soro dos ratos perdeu um maior número de metabolitos do que aqueles que foram formados.

Os compostos identificados presentes na Figura 57 D são apenas alguns dos possíveis metabolitos que se podem encontrar no soro dos ratos sujeitos à toma de ezetimiba, nomeadamente maior quantidade de ácido mirístico, metabolito já encontrado nas NPs extrato, que aumentou tanto na toma de NPs extrato como de ezetimiba, a esfingosina, um aminoálcool constituinte dos esfingolípido associado a uma diminuição do colesterol total [268] e o 1-O-(2-metoxi-hexadecil)-glicerol, um alquilglicerol, associado a uma diminuição do colesterol total [269]. O aumento da presença de esfingosina e 1-O-(2-metoxi-hexadecil)-glicerol pode justificar a eficácia da ezetimiba na redução do colesterol, também observada no ensaio de permeação na barreira gastrointestinal.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Em oposição diminuiu na toma da ezetimiba, relativamente aos ratos controlo, a L-arginina, um aminoácido não essencial associado a uma diminuição do colesterol total e ligeiro aumento do HDL-C [270] e a N-aciletanolamina e o retinal, metabolitos já encontrados nas NPs extrato, no entanto aumentaram na toma de NPs extrato. A diminuição da L-arginina pode promover a redução da síntese de proteínas, hormonas ou neurotransmissores peptídicos em ratos sujeitos à toma de ezetimiba [260].

Neste caso o efeito pode não ser tão pronunciado, pois a administração de ezetimiba *in vivo* durante 5 semanas foi efetuada de forma livre na água de bebida e não por gavagem como na administração de extrato, NPs extrato e extrato + ezetimiba.

A Figura 58 representa a análise dos metabolitos detetados no soro dos ratos controlo relativamente aos metabolitos detetados no soro dos ratos sujeitos à toma de extrato + ezetimiba.

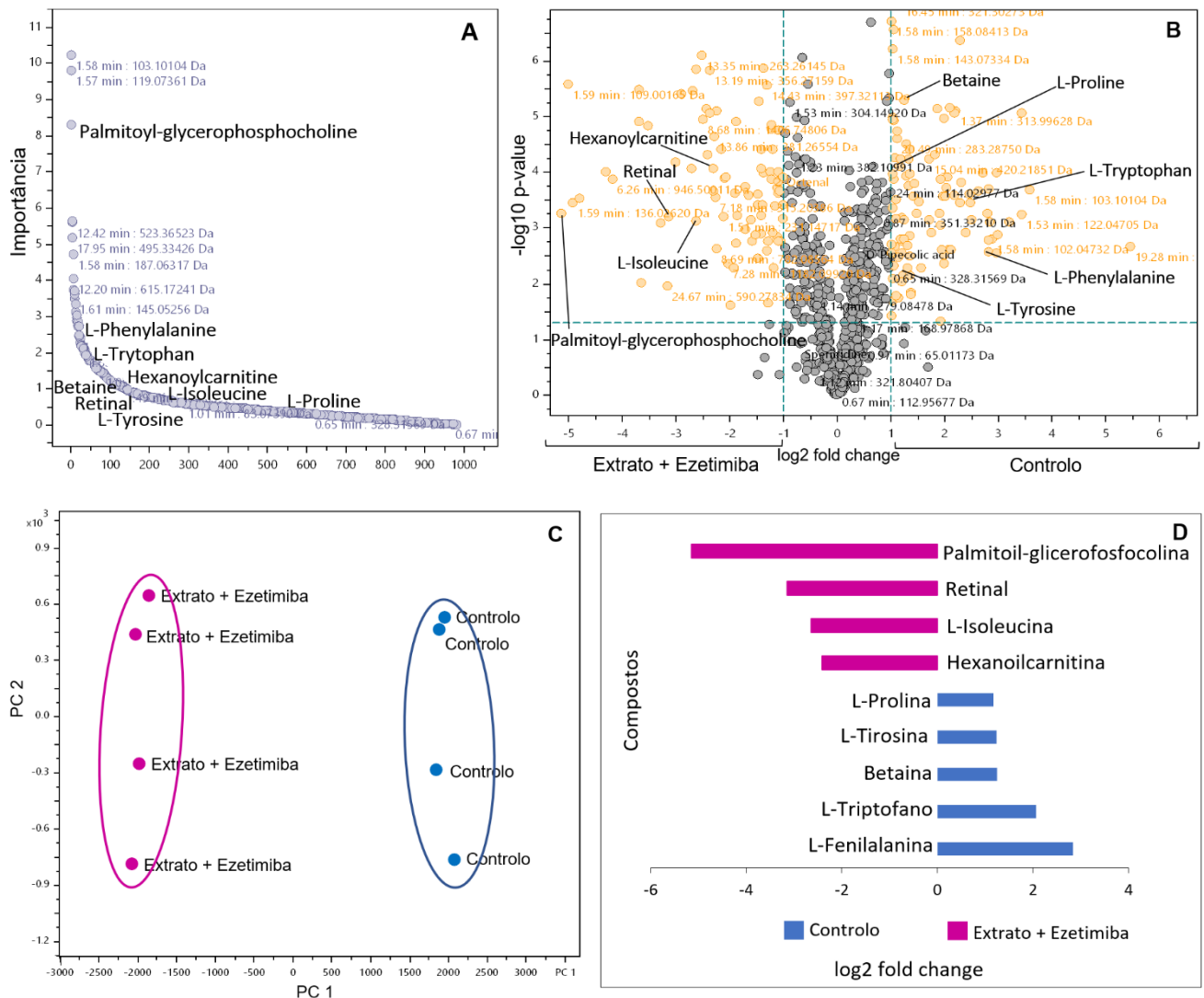


Figura 58 - Representação gráfica: (A) PLS, (B) Volcano, (C) PCA e (D) Compostos identificados, para o soro do rato do controlo e soro do rato em que foi administrado extrato + ezetimiba.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

A partir da Figura 58 B inferiu-se que a amostra do controlo apresentou um grande número de metabolitos que não se encontraram na amostra de extrato e ezetimiba e a amostra de extrato e ezetimiba apresenta muitos metabolitos que não se encontraram no controlo.

Os compostos identificados presentes na Figura 58 D são apenas alguns dos possíveis metabolitos que se podem encontrar no soro dos ratos sujeitos à toma de extrato + ezetimiba, nomeadamente maior quantidade de palmitoil-glicerofosfocolina, um lisofosfolípido, associado a uma diminuição do colesterol total e LDL-C e ao aumento do HDL-C [264]; hexanoilcarnitina, uma acilcarnitina, metabolito que também aumentou na toma das NPs extrato; o retinal, metabolito que decresceu na toma das NPs extrato e a L-Isoleucina, um metabolito já encontrado tanto no extrato como nas NPs extrato e que decresceu em ambos. O aumento da presença de palmitoil-glicerofosfocolina e retinal pode justificar a redução do colesterol observada tanto no ensaio de permeação na barreira gastrointestinal como no ensaio *in vivo* em que se administrou durante 4 semanas o extrato + ezetimiba.

Em oposição diminuiu na toma de extrato + ezetimiba, relativamente aos ratos controlo, a betaína, um aminoácido associado a um ligeiro aumento do colesterol total, mas sem efeito no LDL-C e HDL-C [271] e o L-triptofano, L-fenilalanina, L-prolina e L-tirosina, metabolitos já encontrados no extrato, que decresceram tanto na toma de extrato como extrato + ezetimiba. A diminuição de L-triptofano, L-fenilalanina, L-prolina e L-tirosina pode levar a uma redução na síntese de proteínas, hormonas ou neurotransmissores peptídicos em ratos sujeitos à toma do extrato + ezetimiba [260].

A maioria dos compostos identificados no soro encontram-se relacionados com o metabolismo dos aminoácidos e dos lípidos. No que respeita à análise da metabolómica, a administração do extrato, NPs extrato e extrato + ezetimiba revelaram alterações metabólicas no soro dos ratos relativamente aos ratos de controlo, nomeadamente em termos da redução da síntese de proteínas, hormonas ou neurotransmissores peptídicos. Por outro lado, a administração do extrato, NPs extrato e extrato + ezetimiba promoveu o aumento de metabolitos relacionados com a diminuição do colesterol total, LDL-C e aumento do HDL-C, particularmente lípidos, o que revela o efeito sobre a redução do colesterol, também observada nos ensaios de permeação do colesterol na barreira gastrointestinal e *in vivo* após administração por 4 semanas.

Quando comparando com a literatura, existem poucos estudos de ratos sujeitos à toma de produtos naturais [272], e não foram encontrados estudos para o consumo de algas e NPs associadas.

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

Dos extratos e fração analisadas, todos demonstraram ter um conteúdo muito baixo de proteínas e não foram considerados citotóxicos. Relativamente à sua caracterização geral e potenciais atividades biológicas, a fração purificada de Nori metanol demonstrou ter a maior quantidade de polissacáridos totais ($5,38 \pm 0,75$ mg de PE/mL de extrato) e a maior quantidade de florotaninos. O extrato da alga Nori apresentou a maior inibição da enzima AChE ($23,2 \pm 0,4$ %), que é um alvo na terapêutica da doença de Alzheimer. A fração purificada de Aramé metanol demonstrou ter a maior quantidade de fenóis totais ($0,1521 \pm 0,0035$ mg de PGE/mL de extrato) e, no que respeita ao ensaio da redução da permeação do colesterol, o extrato da Aramé na presença de ezetimiba (42 ± 3 %) foi, à semelhança do extrato da alga Fucus com ezetimiba ($43,5 \pm 0,5$ %), o que demonstrou melhor resultado. O extrato de Aramé apresentou ainda a maior atividade antioxidante (65 ± 3 %) e a maior capacidade de inibir a enzima HMGR (79 ± 7 %) associada ao tratamento da hipercolesterolemia.

De acordo, com o objetivo do trabalho, dos extratos estudados, o mais promissor, relativamente ao potencial de redução de doenças cardiovasculares, foi o extrato de Aramé com o objetivo de melhorar as suas propriedades e poder facilitar a sua administração e absorção. Como tal, este foi o extrato selecionado para a encapsulação em NPs.

As NPs de BSA com o extrato de Aramé encapsulado (NPs Aramé) apresentaram um tamanho menor que 300 nm, índice de polidispersão abaixo de 0,6 e carga superficial negativa. Através da observação das imagens das NPs de BSA por microscopia eletrónica de varrimento inferiu-se que tanto as NPs de BSA vazias (NPs vazias) como as NPs Aramé apresentaram uma forma esférica. No entanto, as NPs vazias demonstraram ter uma distribuição mais uniforme e um tamanho ligeiramente menor, quando comparando com as NPs Aramé. Nos ensaios de avaliação do seu potencial biológico, as NPs Aramé demonstraram menor atividade antioxidante (8 ± 1 %) e maior inibição da enzima AChE (66 ± 7 %) relativamente ao extrato livre.

No caso da aplicação na redução da hipercolesterolemia, as NPs Aramé demonstraram maior capacidade de redução na permeação do colesterol quando associadas à ezetimiba (62 ± 1 %) e da enzima HMGR (87 ± 4 %) relativamente ao extrato livre. Nos ensaios *in vivo* obteve-se um menor valor de colesterol final para os ratos Wistar que consumiram o extrato de Aramé (64 ± 2 mg/dL), Aramé com ezetimiba (68 ± 2 mg/dL) e NPs Aramé (72 ± 2 mg/dL), quando comparados com os ratos controlo (83 ± 3 mg/dL). Tanto o extrato de Aramé como as NPs Aramé demonstraram ser seguras uma vez que não se verificaram alterações histológicas a nível dos órgãos dos ratos sujeitos às tomas.

No que respeita à análise da metabolómica, a administração do extrato de Aramé, NPs Aramé e Aramé + ezetimiba revelaram alterações metabólicas no soro dos ratos relativamente aos ratos de controlo, nomeadamente em termos de metabolitos associados à diminuição do colesterol total, LDL-C e aumento do HDL-C, particularmente lípidos, o que revela o efeito do extrato de Aramé e NPs Aramé sobre a redução do colesterol, também observada nos ensaios de permeação do

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

colesterol na barreira gastrointestinal e *in vivo* após administração por 4 semanas do extrato de Aramé, NPs Aramé e Aramé + ezetimiba. Alguns dos efeitos não demonstraram ser tão pronunciados dada a reduzida absorção intestinal que o extrato e as NPs apresentam.

Num estudo futuro, seria interessante a identificação dos compostos presentes nos extratos das algas em estudo por espectrometria de massa, como forma de se aprofundar o conhecimento sobre estas. Seria interessante testar outras NPs que não de BSA e analisar se a digestão das NPs com enzimas digestivas poderá aumentar a eficácia das NPs Aramé sobre o composto livre, uma vez que estas podem digerir a BSA, sendo posteriormente uma fonte de nutrientes e compostos bioativos. Poderá ser interessante a realização de um ensaio *in vivo* com ratos hipercolesterolémicos em que se avalie especificamente tanto o colesterol total como o HDL-C e LDL-C. Além disso, seria importante aumentar o número de animais por grupo e prolongar a duração do ensaio. Também poderá ser interessante a utilização de animais obesos ou geneticamente modificados. É também importante realizar uma análise mais detalhada no que respeita à metabolómica do soro dos ratos, como forma de se poder identificar um maior número de compostos que mostraram ser significativamente diferentes entre a amostra de controlo e as amostras em estudo e inferir que consequências podem advir da perda e formação destes compostos.

Apesar disso, neste trabalho foi claramente verificado que o extrato de alga Aramé demonstrou potencial contra a hipercolesterolemia, sendo este efeito mais evidente após encapsulação. Para além do estudo efetuado ter sido inovador e um novo contributo para o conhecimento, os resultados obtidos foram excelentes e podem certamente atrair interesse para a utilização das NPs de BSA com extrato de Aramé encapsulado como um potencial nanoproducto num futuro muito próximo no que respeita ao desenvolvimento de terapêuticas de redução do risco de CVDs.

6. Referências Bibliográficas

- [1] World Health Organization, Healthy life expectancy and Life expectancy, (2019). <https://www.who.int/data/gho/data/themes/mortality-and-global-health-estimates/ghe-life-expectancy-and-healthy-life-expectancy> (accessed June 15, 2022).
- [2] A.E. Morgan, K.M. Mooney, S.J. Wilkinson, N.A. Pickles, M.T. Mc Auley, Mathematically Modelling the Dynamics of Cholesterol Metabolism and Ageing, *BioSystems*. 145 (2016) 19–32. <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2016.05.001>.
- [3] A.I. Hijas-Gómez, A. Ayala, M.P. Rodríguez-García, C. Rodríguez-Blázquez, V. Rodríguez-Rodríguez, F. Rojo-Pérez, G. Fernández-Mayoralas, A. Rodríguez-Laso, A. Calderón-Larrañaga, M.J. Forjaz, The WHO active ageing pillars and its association with survival: Findings from a population-based study in Spain, *Arch. Gerontol. Geriatr.* 90 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2020.104114>.
- [4] Cardiovascular Disease Infographic - World Heart Federation, (n.d.). <https://world-heart-federation.org/resource/cardiovascular-disease-infographic/> (accessed March 3, 2022).
- [5] M.C. van Schie, S. Jainandunsing, J.E.R. van Lennepe, Monogenetic disorders of the cholesterol metabolism and premature cardiovascular disease, *Eur. J. Pharmacol.* 816 (2017) 1–28. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.046>.
- [6] J.L. Rodgers, J. Jones, S.I. Bolleddu, S. Vanthenapalli, L.E. Rodgers, K. Shah, K. Karia, S.K. Panguluri, Cardiovascular Risks Associated with Gender and Aging, *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* 6 (2019) 1–18. <https://doi.org/10.3390/jcdd6020019>.
- [7] Z. Gao, Z. Chen, A. Sun, X. Deng, Gender differences in cardiovascular disease, *Med. Nov. Technol. Devices.* 4 (2019) 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.medntd.2019.100025>.
- [8] C. Andersson, R.S. Vasan, Epidemiology of cardiovascular disease in young individuals, *Nat. Rev. Cardiol.* 15 (2018) 230–240. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2017.154>.
- [9] S. Martinez-Hervas, J.F. Ascaso, Hypercholesterolemia, *Encycl. Endocr. Dis.* (2018) 1–7. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65340-0>.
- [10] C. Lammi, C. Zanoni, A. Arnoldi, IAVPGEVA, IAVPTGVA, and LPYP, three peptides from soy glycinin, modulate cholesterol metabolism in HepG2 cells through the activation of the LDLR-SREBP2 pathway, *J. Funct. Foods.* 14 (2015) 469–478. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.02.021>.
- [11] World Health Organization, Cardiovascular Diseases, Key Facts. (2021). [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds)).
- [12] PORDATA - Óbitos por algumas causas de morte (%), (n.d.). [https://www.pordata.pt/Portugal/Óbitos+por+algumas+causas+de+morte+\(percentagem\)-758](https://www.pordata.pt/Portugal/Óbitos+por+algumas+causas+de+morte+(percentagem)-758) (accessed June 4, 2022).
- [13] Our World in Data, Death rate from cardiovascular disease, (2017). <https://ourworldindata.org/grapher/cardiovascular-disease-death-rates>.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- [14] World Health Organization, The top 10 causes of death, (2020). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.
- [15] V.A. Cortes, D. Busso, P. Mardones, A. Maiz, A. Arteaga, F. Nervi, A. Rigotti, Advances in the physiological and pathological implications of cholesterol, *Biol. Rev.* 88 (2013) 1–19. <https://doi.org/10.1111/brv.12025>.
- [16] A. Tsoupras, R. Lordan, I. Zabetakis, Inflammation, not Cholesterol, Is a Cause of Chronic Disease, *Nutrients.* 10 (2018) 1–38. <https://doi.org/10.3390/nu10050604>.
- [17] L. Yuan, F. Zhang, S. Jia, J. Xie, M. Shen, Differences between phytosterols with different structures in regulating cholesterol synthesis, transport and metabolism in Caco-2 cells, *J. Funct. Foods.* 65 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103715>.
- [18] K.K. Patel, K. Kashfi, Lipoproteins and cancer: The role of HDL-C, LDL-C, and cholesterol-lowering drugs, *Biochem. Pharmacol.* 196 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114654>.
- [19] J. Moini, Epidemiology of Diet and Diabetes Mellitus, in: *Epidemiol. Diabetes*, 2019: pp. 57–73. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816864-6.00005-5>.
- [20] T. Huff, B. Boyd, I. Jialal, *Physiology, Cholesterol*, StatPearls Publishing Treasure Island (FL), 2021.
- [21] F.R. Maxfield, G. van Meer, Cholesterol, the central lipid of mammalian cells, *Curr. Opin. Cell Biol.* 22 (2010) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2010.05.004>.Cholesterol.
- [22] K. Simons, R. Ehehalt, Cholesterol, lipid rafts, and disease, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 597–603. <https://doi.org/10.1172/JCI0216390>.
- [23] R.J. Dotson, C.R. Smith, K. Bueche, G. Angles, S.C. Pias, Influence of Cholesterol on the Oxygen Permeability of Membranes: Insight from Atomistic Simulations, *Biophys. J.* 112 (2017) 2336–2347. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2017.04.046>.
- [24] J.M. Berg, J.L. Tymoczko, L. Stryer, The Biosynthesis of Membrane Lipids and Steroids, in: *Biochemistry*, 5th ed., W. H. Freeman, 2002.
- [25] M. Gliozzi, V. Musolino, F. Bosco, M. Scicchitano, F. Scarano, S. Nucera, M.C. Zito, S. Ruga, C. Carresi, R. Macrì, L. Guarnieri, J. Maiuolo, A. Tavernese, A.R. Coppoletta, C. Nicita, R. Mollace, E. Palma, C. Muscoli, C. Belzung, V. Mollace, Cholesterol homeostasis: Researching a dialogue between the brain and peripheral tissues, *Pharmacol. Res.* 163 (2021) 1–71. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.105215>.
- [26] S. Santosa, K.A. Varady, S. AbuMweis, P.J.H. Jones, Physiological and therapeutic factors affecting cholesterol metabolism: Does a reciprocal relationship between cholesterol absorption and synthesis really exist?, *Life Sci.* 80 (2007) 505–514. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.10.006>.
- [27] C.F. Semenkovich, A.C. Goldberg, I.J. Goldberg, Disorders of Lipid Metabolism, in: *Williams Textb. Endocrinol., Thirteenth, Elsevier Inc., 2016: pp. 1660–1700*. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-323-29738-7.00037-X>.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- [28] K. Stemmer, B. Finan, R.D. DiMarchi, M.H. Tschöp, T.D. Müller, Insights into incretin-based therapies for treatment of diabetic dyslipidemia, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 159 (2020) 34–53. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.05.008>.
- [29] S.U. Islam, M.B. Ahmed, H. Ahsan, Y.-S. Lee, Recent Molecular Mechanisms and Beneficial Effects of Phytochemicals and Plant-Based Whole Foods in Reducing LDL-C and Preventing Cardiovascular Disease, *Antioxidants*. 10 (2021) 1–28. <https://doi.org/10.3390/antiox10050784>.
- [30] R. André, R. Pacheco, M. Bourbon, M.L. Serralheiro, Brown Algae Potential as a Functional Food against Hypercholesterolemia: Review, *Foods*. 10 (2021) 1–14. <https://doi.org/10.3390/foods10020234>.
- [31] Chegg Study, Lipid Transport and Liver, (n.d.). <https://www.chegg.com/learn/nutrition/nutrition/lipid-transport-and-liver>.
- [32] I. Karam, Y.J. Yang, J.Y. Li, Hyperlipidemia Background and Progress, *SM Atheroscler. J.* 1 (2017) 1–8.
- [33] J.L. Betters, L. Yu, NPC1L1 and Cholesterol Transport, *FEBS Lett.* 584 (2010) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.030>.
- [34] J.M. Brown, L. Yu, Opposing Gatekeepers of Apical Sterol Transport: Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) and ATP-Binding Cassette Transporters G5 and G8 (ABCG5/ABCG8), *Immunol. Endocr. Metab. Agents Med. Chem.* 9 (2009) 1–20. <https://doi.org/10.2174/187152209788009797>.
- [35] C.-W. Ko, J. Qu, D.D. Black, P. Tso, Regulation of intestinal lipid metabolism: current concepts and relevance to disease, *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 17 (2020) 169–183. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0250-7>.
- [36] R.F. da Costa, V.N. Freire, E.M. Bezerra, B.S. Cavada, E.W.S. Caetano, J.L. De Lima Filho, E.L. Albuquerque, Explaining statin inhibition effectiveness of HMG-CoA reductase by quantum biochemistry computations, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14 (2012) 1389–1398. <https://doi.org/10.1039/c1cp22824b>.
- [37] A.A. Arantes, P.L. Falé, L.C.B. Costa, R. Pacheco, L. Ascensão, M.L. Serralheiro, Inhibition of HMG-CoA reductase activity and cholesterol permeation through Caco-2 cells by caffeoylquinic acids from *Vernonia condensata* leaves, *Rev. Bras. Farmacogn.* 26 (2016) 738–743. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.05.008>.
- [38] K. Ono, Current concept of reverse cholesterol transport and novel strategy for atheroprotection, *J. Cardiol.* 60 (2012) 339–343. <https://doi.org/10.1016/j.jjcc.2012.07.014>.
- [39] G.M. Camerino, O. Musumeci, E. Conte, K. Musaraj, A. Fonzino, E. Barca, M. Marino, C. Rodolico, D. Tricarico, C. Camerino, M.R. Carratù, J.F. Desaphy, A. De Luca, A. Toscano, S. Pierno, Risk of myopathy in patients in therapy with statins: Identification of biological markers in a pilot study, *Front. Pharmacol.* 8 (2017) 1–13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00500>.
- [40] K.-L. Wang, C.J. Liu, T.F. Chao, C.M. Huang, C.H. Wu, S.J. Chen, T.J. Chen, S.J. Lin, C.E.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- Chiang, Statins, risk of diabetes, and implications on outcomes in the general population, *J. Am. Coll. Cardiol.* 60 (2012) 1231–1238. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.05.019>.
- [41] C. Alves, D. Mendes, F. Batel Marques, Statins and risk of cataracts: A systematic review and meta-analysis of observational studies, *Cardiovasc. Ther.* 36 (2018) 1–12. <https://doi.org/10.1111/1755-5922.12480>.
- [42] M. van Heek, D.S. Compton, H.R. Davis, The cholesterol absorption inhibitor, ezetimibe, decreases diet-induced hypercholesterolemia in monkeys, *Eur. J. Pharmacol.* 415 (2001) 79–84. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(01\)00825-1](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(01)00825-1).
- [43] D. Hammersley, M. Signy, Ezetimibe: an update on its clinical usefulness in specific patient groups, *Ther. Adv. Chronic Dis.* 8 (2017) 4–11. <https://doi.org/10.1177/2040622316672544>.
- [44] M.F.J. Stolk, M.C.J.M. Becx, K.C. Kuypers, C.A. Seldenrijk, Severe Hepatic Side Effects of Ezetimibe, *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4 (2006) 908–911. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.04.014>.
- [45] C. Simard, P. Poirier, Ezetimibe-associated myopathy in monotherapy and in combination with a 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, *Can. J. Cardiol.* 22 (2006) 141–144. [https://doi.org/10.1016/S0828-282X\(06\)70253-7](https://doi.org/10.1016/S0828-282X(06)70253-7).
- [46] R. André, L. Guedes, R. Melo, L. Ascensão, R. Pacheco, P.D. Vaz, M.L. Serralheiro, Effect of Food Preparations on In Vitro Bioactivities and Chemical Components of *Fucus vesiculosus*, *Foods*. 9 (2020) 1–20. <https://doi.org/10.3390/foods9070955>.
- [47] N. Hans, A. Malik, S. Naik, Antiviral activity of sulfated polysaccharides from marine algae and its application in combating COVID-19: Mini review, *Bioresour. Technol. Reports*. 13 (2021) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100623>.
- [48] D.M.S. Ali, M.S. Alireza, S.M. Reza, Z. Jayran, S. SeyedAhmad, R.S. Ali, M.S. Saeid, A.-A. Ali, Effect of green tea consumption in treatment of mild to moderate depression in Iranian patients living with HIV: A double-blind randomized clinical trial, *Chinese Herb. Med.* 13 (2021) 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2020.08.002>.
- [49] M. Akhdar, R. Abedini, S. Tavakolpour, Z. Gholibeigian, A. Azizpour, A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of a commercial Aloe vera gel for mitigation of phototherapy side-effects in vitiligo patients, *J. Herb. Med.* 28 (2021) 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.HERMED.2021.100442>.
- [50] J. Zhao, Z. Wang, D. Xu, X. Sun, Identification of antidiabetic components from *Cyclocarya paliurus*, *Food Biosci.* 44 (2021) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101429>.
- [51] Z. Xie, F. Yang, The effects of lycopene supplementation on serum insulin-like growth factor 1 (IGF-1) levels and cardiovascular disease: A dose-response meta-analysis of clinical trials, *Complement. Ther. Med.* 56 (2021) 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2020.102632>.
- [52] D. Martínez-Martínez, A. Soto, B. Gil-Araujo, B. Gallego, A. Chiloeches, M. Lasa, Resveratrol promotes apoptosis through the induction of dual specificity phosphatase 1 and sensitizes prostate cancer cells to cisplatin, *Food Chem. Toxicol.* 124 (2019) 273–279.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.12.014>.

- [53] S. Hong, V.P. Dia, S.J. Baek, Q. Zhong, Nanoencapsulation of apigenin with whey protein isolate: Physicochemical properties, in vitro activity against colorectal cancer cells, and bioavailability, *Leb. Und-Technologie*. 154 (2022) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112751>.
- [54] N.H. Arbain, M. Basri, N. Salim, W.T. Wui, M.B.A. Rahman, Development and Characterization of Aerosol Nanoemulsion System Encapsulating Low Water Soluble Quercetin for Lung Cancer Treatment, *Mater. Today Proc.* 5 (2018) S137–S142. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2018.08.055>.
- [55] M.S. Othman, A.M. Khaled, A.H. Al-Bagawi, M.A. Fareid, R.A. Ghany, O.A. Habotta, A.E.A. Moneim, Hepatorenal protective efficacy of flavonoids from *Ocimum basilicum* extract in diabetic albino rats: A focus on hypoglycemic, antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activities, *Biomed. Pharmacother.* 144 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112287>.
- [56] R. Peñalver, J.M. Lorenzo, G. Ros, R. Amarowicz, M. Pateiro, G. Nieto, Seaweeds as a Functional Ingredient for a Healthy Diet, *Mar. Drugs*. 18 (2020) 1–27. <https://doi.org/10.3390/md18060301>.
- [57] K. Yamagata, Prevention of cardiovascular disease through modulation of endothelial cell function by dietary seaweed intake, *Phytomedicine Plus*. 1 (2021) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100026>.
- [58] E.M. Brown, P.J. Allsopp, P.J. Magee, C.I. Gill, S. Nitecki, C.R. Strain, E.M. Mccorley, Seaweed and human health, *Nutr. Rev.* 72 (2014) 205–216. <https://doi.org/10.1111/nure.12091>.
- [59] K.G. Collins, G.F. Fitzgerald, C. Stanton, R.P. Ross, Looking Beyond the Terrestrial: The Potential of Seaweed Derived Bioactives to Treat Non-Communicable Diseases, *Mar. Drugs*. 14 (2016) 1–31. <https://doi.org/10.3390/md14030060>.
- [60] M. Gómez-Guzmán, A. Rodríguez-Nogales, F. Algieri, J. Gálvez, Potential Role of Seaweed Polyphenols in Cardiovascular-Associated Disorders, *Mar. Drugs*. 16 (2018) 1–21. <https://doi.org/10.3390/md16080250>.
- [61] R.M. Martins, F. Nedel, V.B.S. Guimarães, A.F. da Silva, P. Colepicolo, C.M.P. de Pereira, R.G. Lund, Macroalgae Extracts From Antarctica Have Antimicrobial and Anticancer Potential, *Front. Microbiol.* 9 (2018) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00412>.
- [62] T. Kuda, M. Tsunekawa, H. Goto, Y. Araki, Antioxidant properties of four edible algae harvested in the Noto Peninsula, Japan, *J. Food Compos. Anal.* 18 (2005) 625–633. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2004.06.015>.
- [63] J.-H. Oh, J. Kim, Y. Lee, Anti-inflammatory and anti-diabetic effects of brown seaweeds in high-fat diet-induced obese mice, *Nutr. Res. Pract.* 10 (2016) 42–48. <https://doi.org/10.4162/nrp.2016.10.1.42>.
- [64] J. Silva, C. Alves, R. Freitas, A. Martins, S. Pinteus, J. Ribeiro, H. Gaspar, A. Alfonso, R.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- Pedrosa, Antioxidant and Neuroprotective Potential of the Brown Seaweed *Bifurcaria bifurcata* in an in vitro Parkinson's Disease Model, *Mar. Drugs*. 17 (2019) 1–16. <https://doi.org/10.3390/md17020085>.
- [65] H. Wang, E.V. Ooi, P.O.A. Jr., Antiviral activities of extracts from Hong Kong seaweeds, *J. Zhejiang Univ. Sci. B*. 9 (2008) 969–976. <https://doi.org/10.1631/jzus.B0820154>.
- [66] M. Guinea, V. Franco, L. Araujo-Bazán, I. Rodríguez-Martín, S. González, In vivo UVB-photoprotective activity of extracts from commercial marine macroalgae, *Food Chem. Toxicol.* 50 (2012) 1109–1117. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.01.004>.
- [67] S.M. Zhang, Z.P. Xie, M.L. Xu, L.F. Shi, Cardioprotective effects of fucoidan against hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells, *Pharm. Biol.* 53 (2015) 1352–1357. <https://doi.org/10.3109/13880209.2014.982298>.
- [68] D.M. O’Gorman, C.M. Tierney, O. Brennan, F.J. O’Brien, The Marine-derived, Multi-mineral formula, Aquamin, Enhances Mineralisation of Osteoblast Cells In Vitro, *Phyther. Res.* 26 (2012) 375–380. <https://doi.org/10.1002/ptr.3561>.
- [69] Y.-C. Chen, C.-Y. Cheng, C.-T. Liu, Y.-M. Sue, T.-H. Chen, Y.-H. Hsu, P.-A. Hwang, C.-H. Chen, Alleviative effect of fucoxanthin-containing extract from brown seaweed *Laminaria japonica* on renal tubular cell apoptosis through upregulating Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 in chronic kidney disease mice, *J. Ethnopharmacol.* 224 (2018) 391–399. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.06.023>.
- [70] H. Murad, A. Ghannam, M. Jazzara, A. Odeh, A.W. Allaf, Isolation, Structural characterization, and antiproliferative activity of phycocolloids from the red seaweed *Laurencia papillosa* on MCF-7 human breast cancer cells, *Int. J. Biol. Macromol.* 108 (2018) 916–926. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.11.001>.
- [71] H.A. Jung, M.N. Islam, C.M. Lee, H.O. Jeong, H.Y. Chung, H.C. Woo, J.S. Choi, Promising antidiabetic potential of fucoxanthin isolated from the edible brown algae *Eisenia bicyclis* and *Undaria pinnatifida*, *Fish. Sci.* 78 (2012) 1321–1329. <https://doi.org/10.1007/s12562-012-0552-y>.
- [72] H.A. Jung, A. Roy, J.H. Jung, J.S. Choi, Evaluation of the inhibitory effects of eckol and dieckol isolated from edible brown alga *Eisenia bicyclis* on human monoamine oxidases A and B, *Arch. Pharm. Res.* 40 (2017) 480–491. <https://doi.org/10.1007/s12272-017-0904-3>.
- [73] K. Nisizawa, H. Noda, R. Kikuchi, T. Watanabe, The main seaweed foods in Japan, *Hydrobiologia*. 151–152 (1987) 5–29. <https://doi.org/10.1007/BF00046102>.
- [74] T.I. Imbs, T.N. Zvyagintseva, Phlorotannins are Polyphenolic Metabolites of Brown Algae, *Russ. J. Mar. Biol.* 44 (2018) 263–273. <https://doi.org/10.1134/S106307401804003X>.
- [75] L. Pereira, Biological and therapeutic properties of the seaweed polysaccharides, *Int. Biol. Rev.* 2 (2018) 1–50. <https://doi.org/10.18103/ibr.v2i2.1762>.
- [76] S.-H. Lee, S.-H. Eom, N.-Y. Yoon, M.-M. Kim, Y.-X. Li, S.K. Ha, S.-K. Kim, Fucofuroeckol-A from *Eisenia bicyclis* Inhibits Inflammation in Lipopolysaccharide-Induced Mouse Macrophages

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- via Downregulation of the MAPK/NF- κ B Signaling Pathway, *J. Chem.* 2016 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.1155/2016/6509212>.
- [77] K.L. Venkatraman, A. Mehta, Health Benefits and Pharmacological Effects of *Porphyra* Species, *Plant Foods Hum. Nutr.* 74 (2019) 10–17. <https://doi.org/10.1007/s11130-018-0707-9>.
- [78] P. Baweja, S. Kumar, D. Sahoo, I. Levine, *Biology of Seaweeds*, in: *Seaweed Heal. Dis. Prev.*, Elsevier Inc., 2016: pp. 41–106. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802772-1.00003-8>.
- [79] Q. Li, Z. Feng, T. Zhang, C. Ma, H. Shi, Microplastics in the commercial seaweed nori, *J. Hazard. Mater.* 388 (2020) 1–29. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122060>.
- [80] Y. Rui, Z. Zhaohui, S. Wenshan, L. Bafang, H. Hu, Protective effect of MAAs extracted from *Porphyra tenera* against UV irradiation-induced photoaging in mouse skin, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 192 (2019) 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2018.12.009>.
- [81] N. Do Thi, E.-S. Hwang, Effects of laver extracts on adhesion, invasion, and migration in SK-Hep1 human hepatoma cancer cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 78 (2014) 1044–1051. <https://doi.org/10.1080/09168451.2014.912116>.
- [82] R.E. Cian, S.R. Drago, F.S. de Medina, O. Martínez-Augustin, Proteins and Carbohydrates from Red Seaweeds: Evidence for Beneficial Effects on Gut Function and Microbiota, *Mar. Drugs.* 13 (2015) 5358–5383. <https://doi.org/10.3390/md13085358>.
- [83] T.J. Cho, M.S. Rhee, Health Functionality and Quality Control of Laver (*Porphyra*, *Pyropia*): Current Issues and Future Perspectives as an Edible Seaweed, *Mar. Drugs.* 18 (2020) 1–31. <https://doi.org/10.3390/md18010014>.
- [84] M. Rodrigues, G. Alves, J. Abrantes, A. Falcão, Herb-drug interaction of *Fucus vesiculosus* extract and amiodarone in rats: A potential risk for reduced bioavailability of amiodarone in clinical practice, *Food Chem. Toxicol.* 52 (2013) 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.012>.
- [85] M. Barbosa, P. Valentão, F. Ferreres, Á. Gil-Izquierdo, P.B. Andrade, In vitro multifunctionality of phlorotannin extracts from edible *Fucus* species on targets underpinning neurodegeneration, *Food Chem.* 333 (2020) 1–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127456>.
- [86] O.N. Ayrapetyan, E.D. Obluchinskaya, E. V. Zhurishkina, Y.A. Skorik, D. V. Lebedev, A.A. Kulminskaya, I.M. Lapina, Antibacterial Properties of Fucoindans from the Brown Algae *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea, *Biology (Basel)*. 10 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.3390/biology10010067>.
- [87] M.D. Catarino, A.M.S. Silva, S.M. Cardoso, *Fucaceae*: A Source of Bioactive Phlorotannins, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1–30. <https://doi.org/10.3390/ijms18061327>.
- [88] K. Balina, F. Romagnoli, D. Blumberga, Chemical Composition and Potential Use of *Fucus vesiculosus* from Gulf of Riga, *Energy Procedia.* 95 (2016) 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.egypro.2016.09.010>.
- [89] Y. Kumar, A. Tarafdar, P.C. Badgujar, Seaweed as a Source of Natural Antioxidants:

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- Therapeutic Activity and Food Applications, *J. Food Qual.* 2021 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.1155/2021/5753391>.
- [90] L. Tian, C.M. Li, Y.F. Li, T.M. Huang, N.X. Chao, G.R. Luo, F.R. Mo, Laminarin from Seaweed (*Laminaria japonica*) Inhibits Hepatocellular Carcinoma Through Upregulating Senescence Marker Protein-30, *Cancer Biother. Radiopharm.* 35 (2020) 277–283. <https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3179>.
- [91] G. Rajauria, R. Ravindran, M. Garcia-Vaquero, D.K. Rai, T. Sweeney, J. O'Doherty, Molecular characteristics and antioxidant activity of laminarin extracted from the seaweed species *Laminaria hyperborea*, using hydrothermal-assisted extraction and a multi-step purification procedure, *Food Hydrocoll.* 112 (2021) 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106332>.
- [92] W. Jin, X. He, W. Wu, Y. Bao, S. Wang, M. Cai, W. Zhang, C. Wang, F. Zhang, R.J. Linhardt, G. Mao, W. Zhong, Structural analysis of a glucoglucuronan derived from laminarin and the mechanisms of its anti-lung cancer activity, *Int. J. Biol. Macromol.* 163 (2020) 776–787. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.069>.
- [93] A.M. Walsh, T. Sweeney, C.J. O'Shea, D.N. Doyle, J. V. O'Doherty, Effect of dietary laminarin and fucoidan on selected microbiota, intestinal morphology and immune status of the newly weaned pig, *Br. J. Nutr.* 110 (2013) 1630–1638. <https://doi.org/10.1017/S0007114513000834>.
- [94] Y. Cui, L. Zhu, Y. Li, S. Jiang, Q. Sun, E. Xie, H. Chen, Z. Zhao, W. Qiao, J. Xu, C. Dong, Structure of a laminarin-type β -(1→3)-glucan from brown algae *Sargassum henslowianum* and its potential on regulating gut microbiota, *Carbohydr. Polym.* 255 (2021) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.117389>.
- [95] H. Ozanne, H. Toumi, B. Roubinet, L. Landemarre, E. Lespessailles, R. Daniellou, A. Cesaro, Laminarin Effects, a β -(1,3)-Glucan, on Skin Cell Inflammation and Oxidation, *Cosmetics.* 7 (2020) 1–21. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/cosmetics7030066>.
- [96] L. Pereira, L. Morrison, P.S. Shukla, A.T. Critchley, A concise review of the brown macroalga *Ascophyllum nodosum* (Linnaeus) Le Jolis, *J. Appl. Phycol.* 32 (2020) 3561–3584. <https://doi.org/10.1007/s10811-020-02246-6>.
- [97] O.N. Pozharitskaya, E.D. Obluchinskaya, A.N. Shikov, Mechanisms of Bioactivities of Fucoidan from the Brown Seaweed *Fucus vesiculosus* L. of the Barents Sea, *Mar. Drugs.* 18 (2020) 1–17. <https://doi.org/10.3390/md18050275>.
- [98] N.P. Patil, V. Le, A.D. Sligar, L. Mei, D. Chavarria, E.Y. Yang, A.B. Baker, Algal Polysaccharides as Therapeutic Agents for Atherosclerosis, *Front. Cardiovasc. Med.* 5 (2018) 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2018.00153>.
- [99] S.S. Narayani, S. Saravanan, J. Ravindran, M.S. Ramasamy, J. Chitra, In vitro anticancer activity of fucoidan extracted from *Sargassum cinereum* against Caco-2 cells, *Int. J. Biol. Macromol.* 138 (2019) 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.127>.
- [100] N. V. Krylova, S.P. Ermakova, V.F. Lavrov, I.A. Leneva, G.G. Kompanets, O. V. Lunikhina, M.N. Nosik, L.K. Ebralidze, I.N. Falynskova, A.S. Silchenko, T.S. Zaporozhets, The Comparative

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- Analysis of Antiviral Activity of Native and Modified Fucoidans from Brown Algae *Fucus evanescens* In Vitro and In Vivo, *Mar. Drugs*. 18 (2020) 1–13. <https://doi.org/10.3390/md18040224>.
- [101] X. Zhao, F. Guo, J. Hu, L. Zhang, C. Xue, Z. Zhang, B. Li, Antithrombotic activity of oral administered low molecular weight fucoidan from *Laminaria Japonica*, *Thromb. Res.* 144 (2016) 1–37. <https://doi.org/10.1016/j.thromres.2016.03.008>.
- [102] J. Park, M. Yeom, D.-H. Hahm, Fucoidan improves serum lipid levels and atherosclerosis through hepatic SREBP-2-mediated regulation, *J. Pharmacol. Sci.* 131 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2016.03.007>.
- [103] A.B.A. Ahmed, M. Adel, P. Karimi, M. Peidayesh, Pharmaceutical, Cosmeceutical, and Traditional Applications of Marine Carbohydrates, in: S.-K. Kim (Ed.), *Adv. Food Nutr. Res.*, Elsevier Inc., 2014: pp. 197–220. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800268-1.00010-X>.
- [104] P. Adão, J. Reboleira, M. Teles, B. Santos, N. Ribeiro, C.M. Teixeira, M. Guedes, J.C. Pessoa, S. Bernardino, Enhancement of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Porphyran through Chemical Modification with Tyrosine Derivatives, *Molecules*. 26 (2021) 1–20. <https://doi.org/10.3390/molecules26102916>.
- [105] D. He, L. Yan, X. Ma, Y. Cheng, S. Wu, J. Zuo, E.J. Park, J. Liu, M. Wu, J. Il Choi, H. Tong, Gamma-irradiation degraded sulfated polysaccharide from a new red algal strain *Pyropia yezoensis* Sookwawon 104 with in vitro antiproliferative activity, *Oncol. Lett.* 20 (2020) 1–8. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11952>.
- [106] S. Isaka, K. Cho, S. Nakazono, R. Abu, M. Ueno, D. Kim, T. Oda, Antioxidant and anti-inflammatory activities of porphyran isolated from discolored nori (*Porphyra yezoensis*), *Int. J. Biol. Macromol.* 74 (2015) 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.11.043>.
- [107] G. Pierre, C. Delattre, C. Laroche, P. Michaud, *Galactans and Its Applications*, Springer, Cham, 2014. https://doi.org/10.1007/978-3-319-03751-6_69-1.
- [108] J. Cotas, A. Leandro, P. Monteiro, D. Pacheco, A. Figueirinha, A.M.M. Gonçalves, G. Jorge, L. Pereira, Seaweed Phenolics: From Extraction to Applications, *Mar. Drugs*. 18 (2020) 1–47. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/md18080384>.
- [109] F. Erpel, R. Mateos, J. Pérez-Jiménez, J.R. Pérez-Correa, Phlorotannins: from Isolation and Structural Characterization, to the evaluation of their Antidiabetic and Anticancer Potential, *Food Res. Int.* 137 (2020) 1–40. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109589>.
- [110] M.D. Catarino, A. Silva, M.T. Cruz, N. Mateus, A.M.S. Silva, S.M. Cardoso, Phlorotannins from *Fucus vesiculosus*: Modulation of Inflammatory Response by Blocking NF-κB Signaling Pathway, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21186897>.
- [111] M.D. Catarino, I. Fernandes, H. Oliveira, M. Carrascal, R. Ferreira, A.M.S. Silva, M.T. Cruz, N. Mateus, S.M. Cardoso, Antitumor Activity of *Fucus vesiculosus*-Derived Phlorotannins through Activation of Apoptotic Signals in Gastric and Colorectal Tumor Cell Lines, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.3390/ijms22147604>.

- [112] M.D. Catarino, A.M.S. Silva, N. Mateus, S.M. Cardoso, Optimization of Phlorotannins Extraction from *Fucus vesiculosus* and Evaluation of Their Potential to Prevent Metabolic Disorders, *Mar. Drugs*. 17 (2019) 1–23. <https://doi.org/10.3390/md17030162>.
- [113] Y. Ohno, S. Kondo, K. Tajima, T. Shibata, T. Itoh, Effect of Phlorotannins Isolated From *Eisenia bicyclis* on Melanogenesis in Mouse B16 Melanoma Cells, *Nat. Prod. Commun.* 16 (2021) 1–9. <https://doi.org/10.1177/1934578X211019264>.
- [114] J.-H. Lee, S.-H. Eom, E.-H. Lee, Y.-J. Jung, H.-J. Kim, M.-R. Jo, K.-T. Son, H.-J. Lee, J.H. Kim, M.-S. Lee, Y.-M. Kim, In vitro antibacterial and synergistic effect of phlorotannins isolated from edible brown seaweed *Eisenia bicyclis* against acne-related bacteria, *Algae*. 29 (2014) 47–55. <https://doi.org/10.4490/algae.2014.29.1.047>.
- [115] S.-H. Eom, S.Y. Moon, D.S. Lee, H.J. Kim, K. Park, E.W. Lee, T.H. Kim, Y.H. Chung, M.S. Lee, Y.M. Kim, In vitro antiviral activity of dieckol and phlorofucofuroeckol-A isolated from edible brown alga *Eisenia bicyclis* against murine norovirus, *Algae*. 30 (2015) 241–246. <https://doi.org/10.4490/algae.2015.30.3.241>.
- [116] S.M. Kim, K. Kang, J.S. Jeon, E.H. Jho, C.Y. Kim, C.W. Nho, B.H. Um, Isolation of phlorotannins from *Eisenia bicyclis* and their hepatoprotective effect against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 165 (2011) 1296–1307. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9347-3>.
- [117] Y. Freile-Pelegri, D. Robledo, Bioactive Phenolic Compounds from Algae, in: B. Hernández-Ledesma, M. Herrero (Eds.), *Bioact. Compd. from Mar. Foods Plant Anim. Sources*, Wiley-Blackwell, 2013: pp. 113–129. <https://doi.org/10.1002/9781118412893.ch6>.
- [118] R.P. Rastogi, Richa, R.P. Sinha, S.P. Singh, D.-P. Häder, Photoprotective compounds from marine organisms, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 37 (2010) 537–558. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0718-5>.
- [119] J. Vega, G. Schneider, B.R. Moreira, C. Herrera, J. Bonomi-Barufi, F.L. Figueroa, Mycosporine-Like Amino Acids from Red Macroalgae: UV-Photoprotectors with Potential Cosmeceutical Applications, *Appl. Sci.* 11 (2021) 1–23. <https://doi.org/10.3390/app11115112>.
- [120] H. Kageyama, T. Palaga, T. Takabe, R. Waditee-Sirisattha, DNA damage protecting and free radical scavenging properties of mycosporine-2-glycine from the Dead Sea cyanobacterium in A375 human melanoma cell lines, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 164 (2016) 289–295. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.09.037>.
- [121] R. Ying, Z. Zhang, H. Zhu, B. Li, H. Hou, The Protective Effect of Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) from *Porphyra yezoensis* in a Mouse Model of UV Irradiation-Induced Photoaging, *Mar. Drugs*. 17 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.3390/md17080470>.
- [122] T. Patipong, T. Hibino, R. Waditee-Sirisattha, H. Kageyama, Efficient Bioproduction of Mycosporine-2-glycine, Which Functions as Potential Osmoprotectant, using *Escherichia coli* Cells, *Nat. Prod. Commun.* 12 (2017) 1593–1594. <https://doi.org/10.1177/1934578x1701201017>.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- [123] S. Bhatia, S. Sardana, A. Sharma, C.B.V. De La Cruz, B. Chaugule, L. Khodaie, Development of broad spectrum mycosporine loaded sunscreen formulation from *Ulva fasciata delile*, *BioMedicine*. 9 (2019) 12–18. <https://doi.org/10.1051/bmdcn/2019090317>.
- [124] J. Yoo, J. Kim, J.H. Lee, H. Kim, S.J. Jang, H.H. Seo, S.T. Oh, S.J. Hyeon, H. Ryu, J. Kim, S.H. Moh, Acceleration of somatic cell reprogramming into the induced pluripotent stem cell using a mycosporine-like amino acid, *Porphyra* 334, *Sci. Rep.* 10 (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60680-5>.
- [125] S. Bleakley, M. Hayes, Algal Proteins: Extraction, Application, and Challenges Concerning Production, *Foods*. 6 (2017) 1–34. <https://doi.org/10.3390/foods6050033>.
- [126] A.G. Waghmare, M.K. Salve, J.G. LeBlanc, S.S. Arya, Concentration and characterization of microalgae proteins from *Chlorella pyrenoidosa*, *Bioresour. Bioprocess.* 3 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40643-016-0094-8>.
- [127] J. Fleurence, M. Moránçais, J. Dumay, Seaweed proteins, in: R.Y. Yada (Ed.), *Proteins Food Process.*, Second Ed, Elsevier Ltd., 2018: pp. 245–262. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100722-8.00010-3>.
- [128] L. Beaulieu, Insights into the Regulation of Algal Proteins and Bioactive Peptides Using Proteomic and Transcriptomic Approaches, *Molecules*. 24 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules24091708>.
- [129] E.-Y. Kim, Y.H. Choi, T.-J. Nam, Identification and antioxidant activity of synthetic peptides from phycobiliproteins of *Pyropia yezoensis*, *Int. J. Mol. Med.* 42 (2018) 789–798. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3650>.
- [130] S. Ulagesan, T.-J. Nam, Y.-H. Choi, Extraction and Purification of R-Phycoerythrin Alpha Subunit from the Marine Red Algae *Pyropia Yezoensis* and Its Biological Activities, *Molecules*. 26 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.3390/molecules26216479>.
- [131] J.X. Mesquita, T.V. de Brito, T.P.C. Fontenelle, R.O.S. Damasceno, M.H.L.P. de Souza, J.L. de Souza Lopes, L.M. Beltramini, A.L. dos R. Barbosa, A.L.P. Freitas, Lectin from red algae *Amansia multifida* Lamouroux: Extraction, characterization and anti-inflammatory activity, *Int. J. Biol. Macromol.* 170 (2021) 532–539. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.203>.
- [132] M.A. Vasconcelos, F.V.S. Arruda, V.A. Carneiro, H.C. Silva, K.S. Nascimento, A.H. Sampaio, B. Cavada, E.H. Teixeira, M. Henriques, M.O. Pereira, Effect of Algae and Plant Lectins on Planktonic Growth and Biofilm Formation in Clinically Relevant Bacteria and Yeasts, *Biomed Res. Int.* 2014 (2014) 1–9. <https://doi.org/10.1155/2014/365272>.
- [133] A.C.S. Gondim, S. Roberta Da Silva, L. Mathys, S. Noppen, S. Liekens, A. Holanda Sampaio, C.S. Nagano, C. Renata Costa Rocha, K.S. Nascimento, B.S. Cavada, P.J. Sadler, J. Balzarini, Potent antiviral activity of carbohydrate-specific algal and leguminous lectins from the Brazilian biodiversity, *Medchemcomm.* 10 (2019) 390–398. <https://doi.org/10.1039/c8md00508g>.
- [134] M.F. de A. Alves, F.K. de A. Barreto, M.A. de Vasconcelos, L.G. do Nascimento Neto, R.F. Carneiro, L.T. da Silva, C.S. Nagano, A.H. Sampaio, E.H. Teixeira, Antihyperglycemic and

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- antioxidant activities of a lectin from the marine red algae, *Bryothamnion seaforthii*, in rats with streptozotocin-induced diabetes, *Int. J. Biol. Macromol.* 158 (2020) 773–780. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.04.238>.
- [135] L.D. Hung, P.T.H. Trinh, Structure and anticancer activity of a new lectin from the cultivated red alga, *Kappaphycus striatus*, *J. Nat. Med.* 75 (2021) 223–231. <https://doi.org/10.1007/s11418-020-01455-0>.
- [136] S.H. Haq, G. Al-Ruwaished, M.A. Al-Mutlaq, S.A. Naji, M. Al-Mogren, S. Al-Rashed, Q.T. Ain, A.A. Al-Amro, A. Al-Mussallam, Antioxidant, Anticancer Activity and Phytochemical Analysis of Green Algae, *Chaetomorpha* Collected from the Arabian Gulf, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55309-1>.
- [137] R.L. de Lima, K.M. dos S. Pires-Cavalcante, D.B. de Alencar, F.A. Viana, A.H. Sampaio, S. Saker-Sampaio, In vitro evaluation of antioxidant activity of methanolic extracts obtained from seaweeds endemic to the coast of Ceará, Brazil, *Acta Sci.* 38 (2016) 247–255. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v28i2.27275>.
- [138] A.A. Al-Amro, M.A. Al-Mutlaq, S. Al-Moathe, N. Al-Tukhaif, R. Bin Othaimen, N. Al-Mutairi, S. Al-Rashed, F. Al-Malki, S.H. Haq, Antioxidant Activity of Rhodophyta Algae *Polysiphonia* and *Laurencia* Collected from the Arabian Gulf, *Asian J. Appl. Sci.* 12 (2019) 71–75. <https://doi.org/10.3923/ajaps.2019.71.75>.
- [139] X. Renaudin, M. Lee, M. Shehata, E.-M. Surmann, A.R. Venkitaraman, BRCA2 deficiency reveals that oxidative stress impairs RNaseH1 function to cripple mitochondrial DNA maintenance, *Cell Rep.* 36 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109478>.
- [140] F. Heidari, S. Rabizadeh, M. Ali Mansournia, H. Mirmiranpoor, S.S. Salehi, S. Akhavan, A. Esteghamati, M. Nakhjavani, Inflammatory, oxidative stress and anti-oxidative markers in patients with endometrial carcinoma and diabetes, *Cytokine.* 120 (2019) 186–190. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.05.007>.
- [141] M.A. Ebrahimzadeh, M. Khalili, A.A. Dehpour, Antioxidant activity of ethyl acetate and methanolic extracts of two marine algae, *nannochloropsis oculata* and *gracilaria gracilis* - An in vitro assay, *Brazilian J. Pharm. Sci.* 54 (2018) 1–6. <https://doi.org/10.1590/s2175-97902018000117280>.
- [142] M. Sharifi-Rad, N. V. Anil Kumar, P. Zucca, E.M. Varoni, L. Dini, E. Panzarini, J. Rajkovic, P.V. Tsouh Fokou, E. Azzini, I. Peluso, A. Prakash Mishra, M. Nigam, Y. El Rayess, M. El Beyrouthy, L. Polito, M. Iriti, N. Martins, M. Martorell, A.O. Docea, W.N. Setzer, D. Calina, W.C. Cho, J. Sharifi-Rad, Lifestyle, Oxidative Stress, and Antioxidants: Back and Forth in the Pathophysiology of Chronic Diseases, *Front. Physiol.* 11 (2020) 1–21. <https://doi.org/10.3389/fphys.2020.00694>.
- [143] G. Tini, R. Scagliola, F. Monacelli, G. La Malfa, I. Porto, C. Brunelli, G.M. Rosa, Alzheimer's Disease and Cardiovascular Disease: A Particular Association, *Cardiol. Res. Pract.* 2020 (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1155/2020/2617970>.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- [144] J.M. Tublin, J.M. Adelstein, F. del Monte, C.K. Combs, L.E. Wold, Getting to the Heart of Alzheimer Disease, *Circ. Res.* 124 (2019) 142–149. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313563>.
- [145] A.A. Farooqui, Potential Treatments for Alzheimer's Disease, in: *Neurochem. Asp. Alzheimer's Dis.*, 2017: pp. 279–330. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-809937-7.00008-2>.
- [146] I. Vecchio, L. Sorrentino, A. Paoletti, R. Marra, M. Arbitrio, The State of The Art on Acetylcholinesterase Inhibitors in the Treatment of Alzheimer's Disease, *J. Cent. Nerv. Syst. Dis.* 13 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.1177/11795735211029113>.
- [147] L.W.K. Moodie, K. Sepčić, T. Turk, R. Frangež, J. Svenson, Natural cholinesterase inhibitors from marine organisms, *Nat. Prod. Rep.* 36 (2019) 1053–1092. <https://doi.org/10.1039/c9np00010k>.
- [148] Neurotransmitters (The Neuron) Part 2, (n.d.). <http://what-when-how.com/neuroscience/neurotransmitters-the-neuron-part-2/> (accessed September 8, 2021).
- [149] A. Haake, K. Nguyen, L. Friedman, B. Chakkampambil, G.T. Grossberg, An update on the utility and safety of cholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease, *Expert Opin. Drug Saf.* 19 (2020) 147–157. <https://doi.org/10.1080/14740338.2020.1721456>.
- [150] T.B. Ali, T.R. Schleret, B.M. Reilly, W.Y. Chen, R. Abagyan, Adverse effects of cholinesterase inhibitors in dementia, according to the pharmacovigilance databases of the United-States and Canada, *PLoS One.* 10 (2015) 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144337>.
- [151] J.H. Park, J.H. Ahn, T.K. Lee, C.W. Park, B. Kim, J.C. Lee, D.W. Kim, M.C. Shin, J.H. Cho, C.H. Lee, S.Y. Choi, M.H. Won, Laminarin Pretreatment Provides Neuroprotection Against Forebrain Ischemia/Reperfusion Injury by Reducing Oxidative Stress and Neuroinflammation in Aged Gerbils, *Mar. Drugs.* 18 (2020) 1–14. <https://doi.org/10.3390/md18040213>.
- [152] F. Galisteo-González, J.A. Molina-Bolívar, Systematic study on the preparation of BSA nanoparticles, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 123 (2014) 286–292. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.028>.
- [153] T.A. Ahmed, A.M.S. Alay, S.Z. Okbazghi, N.A. Alhakamy, Two-Step Optimization to Develop a Transdermal Film Loaded With Dapoxetine Nanoparticles: A Promising Technique to Improve Drug Skin Permeation, *Dose-Response An Int. J.* 18 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1177/1559325820923859>.
- [154] Y. Zhao, Y. Zhou, D. Yang, X. Gao, T. Wen, J. Fu, X. Wen, G. Quan, X. Pan, C. Wu, Intelligent and spatiotemporal drug release based on multifunctional nanoparticle-integrated dissolving microneedle system for synergetic chemo-photothermal therapy to eradicate melanoma, *Acta Biomater.* 135 (2021) 164–178. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.09.009>.
- [155] K. Dhingra, A.K. Dinda, S.K. Kottarath, P.K. Chaudhari, F. Verma, Mucoadhesive silver nanoparticle-based local drug delivery system for peri-implantitis management in COVID-19 era. Part 1: antimicrobial and safety in-vitro analysis, *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 12 (2022) 177–181. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2021.11.007>.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- [156] S. Thakur, H. Singh, A. Singh, S. Kaur, A. Sharma, S.K. Singh, S. Kaur, G. Kaur, S.K. Jain, Thermosensitive injectable hydrogel containing carboplatin loaded nanoparticles: A dual approach for sustained and localized delivery with improved safety and therapeutic efficacy, *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 58 (2020) 1–13. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101817>.
- [157] Y. Wang, C. Pi, X. Feng, Y. Hou, L. Zhao, Y. Wei, The Influence of Nanoparticle Properties on Oral Bioavailability of Drugs, *Int. J. Nanomedicine.* 15 (2020) 6295–6310. <https://doi.org/10.2147/IJN.S257269>.
- [158] C. Auría-Soro, T. Nesma, P. Juanes-Velasco, A. Landeira-Viñuela, H. Fidalgo-Gomez, V. Acebes-Fernandez, R. Gongora, M.J.A. Parra, R. Manzano-Roman, M. Fuentes, Interactions of Nanoparticles and Biosystems: Microenvironment of Nanoparticles and Biomolecules in Nanomedicine, *Nanomaterials.* 9 (2019) 1–20. <https://doi.org/10.3390/nano9101365>.
- [159] S. Cao, S. Xu, H. Wang, Y. Ling, J. Dong, R. Xia, X. Sun, Nanoparticles : Oral Delivery for Protein and Peptide Drugs, *AAPS PharmSciTech.* 20 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1325-z>.
- [160] B.V. Bonifácio, P. Bento da Silva, M.A. dos S. Ramos, K.M.S. Negri, T.M. Bauab, M. Chorilli, Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines : a review, *Int. J. Nanomedicine.* 9 (2014) 1–15. <https://doi.org/10.2147/IJN.S52634>.
- [161] N. Lomis, Z.K. Sarfaraz, A. Alruwaih, S. Westfall, D. Shum-Tim, S. Prakash, Albumin Nanoparticle Formulation for Heart-Targeted Drug Delivery: In Vivo Assessment of Congestive Heart Failure, *Pharmaceuticals.* 14 (2021) 1–20. <https://doi.org/10.3390/PH14070697>.
- [162] K. Ganesh, D. Archana, K. Preeti, Galactosylated Albumin Nanoparticles of Simvastatin, 2015.
- [163] A. Santos-Rebelo, P. Kumar, V. Pillay, Y.E. Choonara, C. Eleutério, M. Figueira, A.S. Viana, L. Ascensão, J. Molpeceres, P. Rijo, I. Correia, J. Amaral, S. Solá, C.M.P. Rodrigues, M.M. Gaspar, C.P. Reis, Development and Mechanistic Insight into the Enhanced Cytotoxic Potential of Parvifloron D Albumin Nanoparticles in EGFR-Overexpressing Pancreatic Cancer Cells, *Cancers (Basel).* 11 (2019) 1–23. <https://doi.org/10.3390/cancers11111733>.
- [164] C.P. Reis, R.J. Neufeld, A.J. Ribeiro, F. Veiga, Design of Insulin-Loaded Alginate Nanoparticles: Influence of Calcium Ion on Polymer Gel Matrix Properties, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 12 (2006) 47–52. <https://doi.org/10.2298/CICEQ0601047R>.
- [165] Y. Yuan, M. Ma, Y. Xu, D. Wang, Surface coating of zein nanoparticles to improve the application of bioactive compounds : A review, *Trends Food Sci. Technol.* 120 (2022) 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.12.025>.
- [166] S.A.A. Rizvi, A.M. Saleh, Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology, *Saudi Pharm. J.* 26 (2018) 64–70. <https://doi.org/10.1016/J.JSPS.2017.10.012>.
- [167] C.P. Reis, R.J. Neufeld, A.J. Ribeiro, F. Veiga, Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles, *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 2 (2006) 8–21. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2005.12.003>.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- [168] G. Suffredini, J.E. East, L.M. Levy, New Applications of Nanotechnology for Neuroimaging, *Am. J. Neuroradiol.* 35 (2014) 1246–1253. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A3543>.
- [169] R.S. Hamida, M.A. Ali, A. Redhwan, M.M. Bin-Meferij, Cyanobacteria – A Promising Platform in Green Nanotechnology: A review on Nanoparticles Fabrication and Their Prospective Applications, *Int. J. Nanomedicine.* 15 (2020) 6033–6066. <https://doi.org/10.2147/IJN.S256134>.
- [170] T. Briolay, T. Petithomme, M. Fouet, N. Nguyen-Pham, C. Blanquart, N. Boisgerault, Delivery of cancer therapies by synthetic and bio-inspired nanovectors, *Mol. Cancer.* 20 (2021) 1–24. <https://doi.org/10.1186/s12943-021-01346-2>.
- [171] M. Zaman, E. Ahmad, A. Qadeer, G. Rabbani, R.H. Khan, Nanoparticles in relation to peptide and protein aggregation, *Int. J. Nanomedicine.* 9 (2014) 899–912. <https://doi.org/10.2147/IJN.S54171>.
- [172] D. Verma, N. Gulati, S. Kaul, S. Mukherjee, U. Nagaich, Protein Based Nanostructures for Drug Delivery, *J. Pharm.* (2018) 1–18. <https://doi.org/10.1155/2018/9285854>.
- [173] X. Yu, W. Zhu, Y. Di, J. Gu, Z. Guo, H. Li, D. Fu, C. Jin, Triple-functional albumin-based nanoparticles for combined chemotherapy and photodynamic therapy of pancreatic cancer with lymphatic metastases, *Int. J. Nanomedicine.* 12 (2017) 6771–6785. <https://doi.org/10.2147/IJN.S131295>.
- [174] M. Tarhini, I. Benlyamani, S. Hamdani, G. Agusti, H. Fessi, H. Greige-Gerges, A. Bentaher, A. Elaissari, Protein-Based Nanoparticle Preparation via nanoprecipitation method, *Materials (Basel).* 11 (2018) 1–18. <https://doi.org/10.3390/ma11030394>.
- [175] J.B. Ferrado, A.A. Perez, F.F. Visentini, G.A. Islan, G.R. Castro, L.G. Santiago, Formation and characterization of self-assembled bovine serum albumin nanoparticles as chrysin delivery systems, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 173 (2019) 43–51. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFB.2018.09.046>.
- [176] R. Fang, R. Hao, X. Wu, Q. Li, X. Leng, H. Jing, Bovine serum albumin nanoparticle promotes the stability of quercetin in simulated intestinal fluid, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 6292–6298. https://doi.org/10.1021/JF200718J/ASSET/IMAGES/JF200718J.SOCIAL.JPEG_V03.
- [177] A.C. V. de Guzman, M.A. Razzak, J.H. Cho, J.Y. Kim, S.S. Choi, Curcumin-Loaded Human Serum Albumin Nanoparticles Prevent Parkinson’s Disease-like Symptoms in *C. elegans*, *Nanomaterials.* 12 (2022) 1–13. <https://doi.org/10.3390/nano12050758>.
- [178] N. Gholijani, S.-S. Abolmaali, K. Kalantar, M.-H. Ravanrooy, Therapeutic Effect of Carvacrol-loaded Albumin Nanoparticles on Arthritic Rats, *Iran. J. Pharm. Res.* 19 (2020) 312–320. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.15494.13131>.
- [179] E.S. Bronze-Uhle, B.C. Costa, V.F. Ximenes, P.N. Lisboa-Filho, Synthetic nanoparticles of bovine serum albumin with entrapped salicylic acid, *Nanotechnol. Sci. Appl.* 10 (2017) 11–21. <https://doi.org/10.2147/NSA.S117018>.
- [180] R. Sookhklari, B. Geramizadeh, M. Abkar, M. Moosavi, The neuroprotective effect of BSA-

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- based nanocurcumin against 6-OHDA-induced cell death in SH-SY5Y cells, *Avicenna J. Phytomedicine*. 9 (2019) 92–100. <https://doi.org/10.22038/ajp.2018.11592>.
- [181] Y. Ren, Y. Feng, K. Xu, S. Yue, T. Yang, K. Nie, M. Xu, H. Xu, X. Xiong, F. Körte, M. Barbeck, P. Zhang, L. Liu, Enhanced Bioavailability of Dihydrotanshinone I–Bovine Serum Albumin Nanoparticles for Stroke Therapy, *Front. Pharmacol.* 12 (2021) 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.721988>.
- [182] Z. Ge, R. Ma, G. Xu, Z. Chen, D. Zhang, Q. Wang, L. Hei, W. Ma, Development and In Vitro Release of Isoniazid and Rifampicin-Loaded Bovine Serum Albumin Nanoparticles, *Med. Sci. Monit.* 24 (2018) 473–478. <https://doi.org/10.12659/MSM.905581>.
- [183] M. Lopes, D. Aniceto, M. Abrantes, S. Simões, F. Branco, I. Vitória, M.F. Botelho, R. Seça, F. Veiga, A. Ribeiro, In vivo biodistribution of antihyperglycemic biopolymer-based nanoparticles for the treatment of type 1 and type 2 diabetes, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 113 (2017) 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2016.11.037>.
- [184] R. Chaudhary, K. Nawaz, A.K. Khan, C. Hano, B.H. Abbasi, S. Anjum, An Overview of the Algae-Mediated Biosynthesis of Nanoparticles and Their Biomedical Applications, *Biomolecules*. 10 (2020) 1–36. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/biom10111498>.
- [185] D. Borah, N. Das, N. Das, A. Bhattacharjee, P. Sarmah, K. Ghosh, M. Chandel, J. Rout, P. Pandey, N.N. Gosh, C.R. Bhattacharjee, Alga-mediated facile green synthesis of silver nanoparticles: Photophysical, catalytic and antibacterial activity, 34 (2020) 1–10. <https://doi.org/10.1002/aoc.5597>.
- [186] S. Rajeshkumar, C. Malarkodi, K. Paulkumar, M. Vanaja, G. Gnanajobitha, G. Annadurai, Algae Mediated Green Fabrication of Silver Nanoparticles and Examination of Its Antifungal Activity against Clinical Pathogens, *Int. J. Met.* 2014 (2014) 1–8. <https://doi.org/https://doi.org/10.1155/2014/692643>.
- [187] D. Acharya, S. Satapathy, P. Somu, U.K. Parida, G. Mishra, Apoptotic Effect and Anticancer Activity of Biosynthesized Silver Nanoparticles from Marine Algae *Chaetomorpha linum* Extract Against Human Colon Cancer Cell HCT-116, *Biol. Trace Elem. Res.* 199 (2020) 1812–1822. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02304-7>.
- [188] L.F. Cunha, M.A. Ongaratto, M. Endres, A.G. Barschak, Modelling hypercholesterolaemia in rats using high cholesterol diet, *Int. J. Exp. Pathol.* 102 (2021) 74–79. <https://doi.org/10.1111/iep.12387>.
- [189] N. Hudz, O. Yezerska, M. Shanaida, V.H. Sedláčková, P.P. Wiczorek, Application of the Folin-Ciocalteu method to the evaluation of *Salvia sclarea* extracts, *Pharmacia*. 66 (2019) 209–215. <https://doi.org/10.3897/pharmacia.66.e38976>.
- [190] G.A. Agbor, J.A. Vinson, P.E. Donnelly, Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay, *Int. J. Food Sci. Nutr. Diet.* 3 (2014) 147–156. <https://doi.org/10.19070/2326-3350-1400028>.
- [191] S. Kupina, C. Fields, M.C. Roman, S.L. Brunelle, Determination of Total Phenolic Content Using the Folin-C Assay: Single-Laboratory Validation, *First Action 2017.13*, *J. AOAC Int.* 101

- (2018) 1466–1472. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0031>.
- [192] L. Ford, K. Theodoridou, G.N. Sheldrake, P.J. Walsh, A critical review of analytical methods used for the chemical characterisation and quantification of phlorotannin compounds in brown seaweeds, *Phytochem. Anal.* 30 (2019) 587–599. <https://doi.org/10.1002/pca.2851>.
- [193] M. Oktay, I. Gülçin, Ö.I. Küfrevioğlu, Determination of in vitro antioxidant activity of fennel (*Foeniculum vulgare*) seed extracts, *LWT - Food Sci. Technol.* 36 (2003) 263–271. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(02\)00226-8](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(02)00226-8).
- [194] S. Parys, A. Rosenbaum, S. Kehraus, G. Reher, K.-W. Glombitza, G.M. König, Evaluation of Quantitative Methods for the Determination of Polyphenols in Algal Extracts, *J. Nat. Prod.* 70 (2007) 1865–1870. <https://doi.org/10.1021/np070302f>.
- [195] A. Gorg, 2-D Electrophoresis. Principles and Methods., Handbook. (2004) 38–40.
- [196] K. Stojilkovski, N. Uranič, D. Kolar, S. Kreft, Simple method for the determination of polysaccharides in herbal syrup, *J. Carbohydr. Chem.* 37 (2019) 1–11. <https://doi.org/10.1080/07328303.2019.1567754>.
- [197] W.-H. Zhang, J. Wu, L. Weng, H. Zhang, J. Zhang, A. Wu, An Improved Phenol-Sulfuric Acid Method for the Determination of Carbohydrates in the Presence of Persulfate, *Carbohydr. Polym.* 227 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115332>.
- [198] M. Viel, F. Collet, C. Lanos, Chemical and multi-physical characterization of agro-resources' by-product as a possible raw building material, *Ind. Crops Prod.* 120 (2018) 214–237. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.04.025>.
- [199] T. Masuko, A. Minami, N. Iwasaki, T. Majima, S.I. Nishimura, Y.C. Lee, Carbohydrate analysis by a phenol-sulfuric acid method in microplate format, *Anal. Biochem.* 339 (2005) 69–72. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2004.12.001>.
- [200] A. Bahuguna, I. Khan, V.K. Bajpai, S.C. Kang, MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug, *Bangladesh J. Pharmacol.* 12 (2017) 115–118. <https://doi.org/10.3329/bjp.v12i2.30892>.
- [201] L. Tolosa, M.T. Donato, M.J. Gómez-Lechón, General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay, in: M. Vinken, V. Rogiers (Eds.), *Protoc. Vit. Hepatocyte Res.*, Humana Press, 2015: pp. 333–348. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_26.
- [202] E. Grela, J. Kozłowska, A. Grabowiecka, Current methodology of MTT assay in bacteria – A review, *Acta Histochem.* 120 (2018) 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2018.03.007>.
- [203] P. Nithya, C. Madhavi, Antioxidant activity of 3-arylidene-4-piperidones in the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl scavenging assay, *J. Taibah Univ. Sci.* 11 (2017) 40–45. <https://doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.11.007>.
- [204] S. Agatonovic-Kustrin, D. Mortona, P.A. Yusof, Reversed Phase HPTLC-DPPH Free Radical Assay as a Screening Method for Antioxidant Activity in Marine Crude Extracts, *J. Oceanogr. Mar. Res.* 2 (2014) 2–5. <https://doi.org/10.4172/2332-2632.1000e112>.
- [205] J. Teixeira, A. Gaspar, E.M. Garrido, J. Garrido, F. Borges, Hydroxycinnamic Acid Antioxidants: An Electrochemical Overview, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 1–11.

<https://doi.org/10.1155/2013/251754>.

- [206] N.B. Sadeer, D. Montesano, S. Albrizio, G. Zengin, M.F. Mahomoodally, The Versatility of Antioxidant Assays in Food Science and Safety—Chemistry, Applications, Strengths, and Limitations, *Antioxidants*. 9 (2020) 1–39. <https://doi.org/10.3390/antiox9080709>.
- [207] P.L. Falé, C. Ferreira, A.M. Rodrigues, P. Cleto, P.J.A. Madeira, M.H. Florêncio, F.N. Frazão, M.L.M. Serralheiro, Antioxidant and anti-acetylcholinesterase activity of commercially available medicinal infusions after in vitro gastrointestinal digestion, *J. Med. Plants Res.* 7 (2013) 1370–1378. <https://doi.org/10.5897/jmpr13.4438>.
- [208] M.F. Frasco, D. Fournier, F. Carvalho, L. Guilhermino, Do metals inhibit acetylcholinesterase (AChE)? Implementation of assay conditions for the use of AChE activity as a biomarker of metal toxicity, *Biomarkers*. 10 (2005) 360–375. <https://doi.org/10.1080/13547500500264660>.
- [209] B.W. Wilson, *Cholinesterases*, 3rd ed., 2010. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00068-9>.
- [210] F. Worek, P. Eyer, H. Thiermann, Determination of acetylcholinesterase activity by the Ellman assay: A versatile tool for in vitro research on medical countermeasures against organophosphate poisoning, *Drug Test. Anal.* 4 (2012) 282–291. <https://doi.org/10.1002/dta.337>.
- [211] Sigma-Aldrich, HMG-CoA Reductase (HMGR) Assay Kit, (n.d.) 1–3. <https://www.claire.co.uk/component/phocadownload/category/17-technical-bulletins?download=668:tb-19-managing-risks-and-liabilities-associated-with-per-and-polyfluoroalkyl-substances-pfass-2019>.
- [212] M. Son, A. Baek, S. Sakkiah, C. Park, S. John, K.W. Lee, Exploration of virtual candidates for human HMG-CoA reductase inhibitors using pharmacophore modeling and molecular dynamics simulations, *PLoS One*. 8 (2013) 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083496>.
- [213] M. Maares, H. Haase, A Guide to Human Zinc Absorption: General Overview and Recent Advances of In Vitro Intestinal Models, *Nutrients*. 12 (2020) 1–45. <https://doi.org/10.3390/nu12030762>.
- [214] P.L. Falé, C. Ferreira, F. Maruzzella, M.H. Florêncio, F.N. Frazão, M.L.M. Serralheiro, Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of *Annona cherimola* leaves, *J. Ethnopharmacol.* 150 (2013) 718–723. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.029>.
- [215] A. Santos-Rebelo, C. Garcia, C. Eleutério, A. Bastos, S.C. Coelho, M.A.N. Coelho, J. Molpeceres, A.S. Viana, L. Ascensão, J.F. Pinto, M.M. Gaspar, P. Rijo, C.P. Reis, Development of Parvifloron D-Loaded Smart Nanoparticles to Target Pancreatic Cancer, *Pharmaceutics*. 10 (2018) 1–15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10040216>.
- [216] N. Ural, The significance of scanning electron microscopy (SEM) analysis on the microstructure of improved clay: An overview, *Open Geosci.* 13 (2021) 197–218. <https://doi.org/10.1515/geo-2020-0145>.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- [217] D.R. Allen, B.C. McWhinney, Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications, *Clin. Biochem. Rev.* 40 (2019) 135–146. <https://doi.org/10.33176/AACB-19-00023>.
- [218] S.-H. Eom, Y.-M. Kang, J.-H. Park, D.-U. Yu, E.-T. Jeong, M.-S. Lee, Y.-M. Kim, Enhancement of Polyphenol Content and Antioxidant Activity of Brown Alga *Eisenia bicyclis* Extract by Microbial Fermentation, *Fish. Aquat. Sci.* 14 (2011) 192–197. <https://doi.org/10.5657/FAS.2011.0192>.
- [219] A. Jiménez-Escrig, I. Jiménez-Jiménez, R. Pulido, F. Saura-Calixto, Antioxidant activity of fresh and processed edible seaweeds, *J. Sci. Food Agric.* 81 (2001) 530–534. <https://doi.org/10.1002/jsfa.842>.
- [220] J. O' Connor, S. Meaney, G.A. Williams, M. Hayes, Extraction of Protein from Four Different Seaweeds Using Three Different Physical Pre-Treatment Strategies, *Molecules.* 25 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules25082005>.
- [221] J. Morrissey, S. Kraan, M.D. Guiry, M. Ryan, A guide to commercially important seaweeds on the Irish coast, 2001. www.bim.ie.
- [222] J.C. Boik, *Natural Compounds in Cancer Therapy*, 1st ed., Minnesota: Oregon Medical Press, 2001.
- [223] Y. Kim, J.B. Keogh, P.M. Clifton, Polyphenols and Glycemic Control, *Nutrients.* 8 (2016) 1–27. <https://doi.org/10.3390/nu8010017>.
- [224] J.S. Choi, S. Haulader, S. Karki, H.J. Jung, H.R. Kim, H.A. Jung, Acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitory activities of the edible brown alga *Eisenia bicyclis*, *Arch. Pharm. Res.* 38 (2015) 1477–1487. <https://doi.org/10.1007/s12272-014-0515-1>.
- [225] C.W. Lee, Y.T. Ahn, R. Zhao, Y.S. Kim, S.M. Park, D.H. Jung, J.K. Kim, H.W. Kim, S.C. Kim, W.G. An, Inhibitory Effects of *Porphyra tenera* Extract on Oxidation and Inflammatory Responses, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2021 (2021) 1–10. <https://doi.org/10.1155/2021/6650037>.
- [226] L. Guedes, B.P.S. Reis, Pedro, M. Machuqueiro, A. Ressaissi, R. Pacheco, M.L. Serralheiro, Bioactivities of *Centaurium erythraea* (Gentianaceae) Decoctions: Antioxidant Activity, Enzyme Inhibition and Docking Studies, *Phytomedicine.* 24 (2019) 1–18. <https://doi.org/10.3390/molecules24203795>.
- [227] I.E. Orhan, D. Jedrejek, F.S. Senol, R.E. Salmas, S. Durdagi, I. Kowalska, L. Pecio, W. Oleszek, Molecular modeling and in vitro approaches towards cholinesterase inhibitory effect of some natural xanthohumol, naringenin, and acyl phloroglucinol derivatives, *Phytomedicine.* 42 (2018) 25–33. <https://doi.org/10.1016/J.PHYMED.2018.03.009>.
- [228] I. Rjeibi, R. Zaabi, W. Jouda, Characterization of Polysaccharides Extracted from Pulps and Seeds of *Crataegus azarolus* L. var. *aronia*: Preliminary Structure, Antioxidant, Antibacterial, α -Amylase, and Acetylcholinesterase Inhibition Properties, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020 (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1155/2020/1903056>.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- [229] Y.E. Jeon, X.F. Yin, S.S. Lim, C.-K. Chung, I.-J. Kang, Antioxidant Activities and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities from Seaweed Extracts, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 41 (2012) 443–449. <https://doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.4.443>.
- [230] J.H. Choi, C.M. Ko, Food and Drug Interactions, *J. Lifestyle Med.* 7 (2017) 1–9. <https://doi.org/10.15280/jlm.2017.7.1.1>.
- [231] F.F. Visentini, A.A. Perez, L.G. Santiago, Bioactive compounds: Application of albumin nanocarriers as delivery systems, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2022) 1–31. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2045471>.
- [232] P. Szymaszek, P. Fiedor, A. Chachaj-Brekiesz, M. Tyszka-Czochara, T. Świergosz, J. Ortyl, Molecular interactions of bovine serum albumin (BSA) with pyridine derivatives as candidates for non-covalent protein probes: a spectroscopic investigation, *J. Mol. Liq.* 347 (2022) 118262. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2021.118262>.
- [233] M.X. Luo, S. Hua, Q.Y. Shang, Application of nanotechnology in drug delivery systems for respiratory diseases (Review), *Mol. Med. Rep.* 23 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.11964>.
- [234] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, S. Khorasani, M.R. Mozafari, Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems, *Pharmaceutics.* 10 (2018) 1–17. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057>.
- [235] M.P. Desai, V. Labhassetwar, G.L. Amidon, R.J. Levy, Gastrointestinal Uptake of Biodegradable Microparticles: Effect of Particle Size, *Pharm. Res.* 13 (1996) 1838–1845. <https://doi.org/10.1023/A:1016085108889>.
- [236] T. Mudalige, H. Qu, D. Van Haute, S.M. Ansar, A. Paredes, T. Ingle, Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges, in: *Nanomater. Food Appl.*, Elsevier Inc., 2019: pp. 313–353. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814130-4.00011-7>.
- [237] A. Barhoum, M.L. García-Betancourt, H. Rahier, G. Van Assche, Physicochemical characterization of nanomaterials: Polymorph, composition, wettability, and thermal stability, in: *Emerg. Appl. Nanoparticles Archit. Nanostructures Curr. Prospect. Futur. Trends*, Elsevier Inc., 2018: pp. 255–278. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-51254-1.00009-9>.
- [238] Y. Yamamoto, Y. Nagasaki, Y. Kato, Y. Sugiyama, K. Kataoka, Long-circulating poly(ethylene glycol)-poly(D,L-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge, *J. Control. Release.* 77 (2001) 27–38. [https://doi.org/10.1016/S0168-3659\(01\)00451-5](https://doi.org/10.1016/S0168-3659(01)00451-5).
- [239] Drug Delivery FAQs, (n.d.). <https://www.sigmaaldrich.com/PT/en/technical-documents/technical-article/materials-science-and-engineering/drug-delivery/drug-delivery-questions> (accessed April 5, 2022).
- [240] A.H. Mota, N. Duarte, A.T. Serra, A. Ferreira, M.R. Bronze, L. Custódio, M.M. Gaspar, S. Simões, P. Rijo, L. Ascensão, P. Faísca, A.S. Viana, R. Pinto, P. Kumar, A.J. Almeida, C.P. Reis, Further Evidence of Possible Therapeutic Uses of *Sambucus nigra* L. Extracts by the

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- Assessment of the In Vitro and In Vivo Anti-Inflammatory Properties of Its PLGA and PCL-Based Nanoformulations, *Pharmaceutics*. 12 (2020) 1–28. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12121181>.
- [241] E. Brito, A. Silva, P.L.V. Falé, R. Pacheco, A. Serralheiro, P.I. Haris, L. Ascensão, M.L. Serralheiro, Serum Albumin Modulates the Bioactivity of Rosmarinic Acid, *J. Med. Food*. 21 (2018) 801–807. <https://doi.org/10.1089/JMF.2017.0086>.
- [242] M.S. Zafar, A. Quarta, M. Marradi, A. Ragusa, Recent Developments in the Reduction of Oxidative Stress through Antioxidant Polymeric Formulations, *Pharmaceutics*. 11 (2019) 1–25. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS11100505>.
- [243] Z. Yu, S. Wu, W. Zhao, L. Ding, Y. Fan, D. Shiuan, J. Liu, F. Chen, Anti-alzheimers activity and molecular mechanism of albumin-derived peptides against AChE and BChE, *Food Funct*. 9 (2018) 1173–1178. <https://doi.org/10.1039/c7fo01462g>.
- [244] M.L. Cacicedo, G.A. Islan, I.E. León, V.A. Álvarez, I. Chourpa, E. Allard-Vannier, N. García-Aranda, Z. V. Díaz-Riascos, Y. Fernández, S. Jr Schwartz, I. Abasolo, G.R. Castro, Bacterial cellulose hydrogel loaded with lipid nanoparticles for localized cancer treatment, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 170 (2018) 596–608. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.06.056>.
- [245] Nurhidajah, R. Astuti, Nurrahman, Black Rice Potential in HDL and LDL Profile in Sprague Dawley Rat with High Cholesterol Diet, *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci*. 292 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/292/1/012019>.
- [246] A.R. Ganesan, K. Subramani, B. Balasubramanian, W.C. Liu, M.V. Arasu, N.A. Al-Dhabi, V. Duraipandiyan, Evaluation of in vivo sub-chronic and heavy metal toxicity of under-exploited seaweeds for food application, *J. King Saud Univ. - Sci*. 32 (2020) 1088–1095. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.10.005>.
- [247] L. Mišurcová, J. Ambrožová, D. Samek, Seaweed Lipids as Nutraceuticals, in: *Adv. Food Nutr. Res.*, 2011: pp. 339–355. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387669-0.00027-2>.
- [248] A. Nakamura, K. Sato, M. Kanazawa, M. Kondo, H. Endo, T. Takahashi, E. Nozaki, Impact of decreased insulin resistance by ezetimibe on postprandial lipid profiles and endothelial functions in obese, non-diabetic-metabolic syndrome patients with coronary artery disease, *Heart Vessels*. 34 (2019) 916–925. <https://doi.org/10.1007/s00380-018-1319-x>.
- [249] M. Yitshak-Sade, N. Mendelson, V. Novack, S. Codish, I.F. Liberty, The association between an increase in glucose levels and armed conflict-related stress: A population-based study, *Sci. Rep*. 10 (2020) 1–6. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58679-z>.
- [250] S.M. Cardoso, O.R. Pereira, A.M.L. Seca, D.C.G.A. Pinto, A.M.S. Silva, Seaweeds as preventive agents for cardiovascular diseases: From nutrients to functional foods, *Mar. Drugs*. 13 (2015) 6838–6865. <https://doi.org/10.3390/md13116838>.
- [251] C.M. Lima, A.K. Lima, M.G.D. Melo, G.A.A. Dória, B.L.S. Leite, M.R. Serafim, R.L.C. Albuquerque-Júnior, A.A.S. Araújo, Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- Tiradentes, *Sci. Plena*. 10 (2014) 1–9. <https://www.scienciaplena.org.br/sp/article/view/1784>.
- [252] B. Worley, R. Powers, *Multivariate Analysis in Metabolomics*, *Curr. Metabolomics*. 1 (2013) 1–31. <https://doi.org/10.2174/2213235x11301010092>.
- [253] J.C. García-Cañaveras, N. Jiménez, M.J. Gómez-Lechón, J. V. Castell, M.T. Donato, A. Lahoz, LC-MS untargeted metabolomic analysis of drug-induced hepatotoxicity in HepG2 cells, *Electrophoresis*. 36 (2015) 2294–2302. <https://doi.org/10.1002/elps.201500095>.
- [254] M. Hur, A.A. Campbell, M. Almeida-de-Macedo, L. Li, N. Ransom, A. Jose, M. Crispin, B.J. Nikolau, E.S. Wurtele, A global approach to analysis and interpretation of metabolic data for plant natural product discovery, *Nat. Prod. Rep.* 30 (2013) 1–33. <https://doi.org/10.1039/c3np20111b.A>.
- [255] K. Hamana, M. Kobayashi, T. Furuchi, H. Hayashi, M. Niitsu, Polyamine analysis of brown-algal seaweeds (class Phaeophyceae) from food markets-Distribution of diaminohexane, penta-amines, and hexa-amine, *Microb. Resour. Syst.* 33 (2017) 3–8.
- [256] A. Jafarnejad, S.Z. Bathaie, M. Nakhjavani, M.Z. Hassan, Effect of spermine on lipid profile and HDL functionality in the streptozotocin-induced diabetic rat model, *Life Sci.* 82 (2008) 301–307. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.11.015>.
- [257] K.J.E. Sattler, Ş. Elbasan, P. Keul, M. Elter-Schulz, C. Bode, M.H. Gräler, M. Bröcker-Preuss, T. Budde, R. Erbel, G. Heusch, B. Levkau, Sphingosine 1-phosphate levels in plasma and HDL are altered in coronary artery disease, *Basic Res. Cardiol.* 105 (2010) 821–832. <https://doi.org/10.1007/s00395-010-0112-5>.
- [258] B. Levkau, HDL-S1P: Cardiovascular functions, disease-associated alterations, and therapeutic applications, *Front. Pharmacol.* 6 (2015) 1–7. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00243>.
- [259] L. plasma levels of amino acids and related compounds during stress Milakfsky, T.A. Hare, J.M. Miller, W.H. Vogel, Rat plasma levels of amino acids and related compounds during stress, *Life Sci.* 36 (1985) 753–761. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(85\)90195-X](https://doi.org/10.1016/0024-3205(85)90195-X).
- [260] National Research Council, *Protein and Amino Acids*, in: *Recomm. Diet. Allow.*, 10th ed., National Academies Press, Washington (DC), 1989: pp. 52–77. <https://doi.org/10.17226/1349>.
- [261] D. Noto, F. Fayer, A.B. Cefalù, I. Altieri, O. Palesano, R. Spina, V. Valenti, M. Pitrone, G. Pizzolanti, C.M. Barbagallo, C. Giordano, M.R. Averna, Myristic acid is associated to low plasma HDL cholesterol levels in a Mediterranean population and increases HDL catabolism by enhancing HDL particles trapping to cell surface proteoglycans in a liver hepatoma cell model, *Atherosclerosis*. 246 (2016) 50–56. <https://doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2015.12.036>.
- [262] M.S. Afonso, M.S.F. Lavrador, M.K. Koike, D.E. Cintra, F.D. Ferreira, V.S. Nunes, G. Castilho, L.A. Gioielli, R. Paula Bombo, S. Catanozi, E.G. Caldini, N.R. Damaceno-Rodrigues, M. Passarelli, E.R. Nakandakare, A.M. Lottenberg, Dietary interesterified fat enriched with palmitic acid induces atherosclerosis by impairing macrophage cholesterol efflux and eliciting

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

- inflammation, *J. Nutr. Biochem.* 32 (2016) 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.01.005>.
- [263] P. Rinne, R. Guillaumat-Prats, M. Rami, L. Bindila, L. Ring, L.P. Lyytikainen, E. Raitoharju, N. Oksala, T. Lehtimäki, C. Weber, E.P.C. Van der Vorst, S. Steffens, Palmitoylethanolamide Promotes a Proresolving Macrophage Phenotype and Attenuates Atherosclerotic Plaque Formation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 38 (2018) 2562–2575. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.311185>.
- [264] A.-R. Han, H.R. Park, G.J. Kim, B. Kim, Y. Kim, H.H. Park, J. Park, C.H. Jin, J.M. Kim, S. Kwon, J. Kim, S. Cao, J. Nam, H. Choi, 18:0 Lyso PC Derived by Bioactivity-Based Molecular Networking from Lentil Mutant Lines and Its Effects on High-Fat Diet-Induced Obese Mice, *Molecules.* 26 (2021) 1–15. <https://doi.org/https://doi.org/10.3390/molecules26247547>.
- [265] T. Yin Wong, F.M.A. Islam, R. Klein, B.E.K. Klein, M.F. Cotch, C. Castro, A.R. Sharrett, E. Shahar, Retinal vascular caliber, cardiovascular risk factors, and inflammation: The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA), *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (2006) 2341–2350. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1539>.
- [266] G. Michelson, S. Wärntges, S. Leidig, J. Lötsch, G. Geisslinger, Nimodipine plasma concentration and retinal blood flow in healthy subjects, *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47 (2006) 3479–3486. <https://doi.org/10.1167/iovs.05-1350>.
- [267] K. Yang, J. Wang, H. Xiang, P. Ding, T. Wu, G. Ji, LCAT- targeted therapies: Progress, failures and future, *Biomed. Pharmacother.* 147 (2022) 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.112677>.
- [268] I. Duivenvoorden, P.J. Voshol, P.C. Rensen, W. van Duyvenvoorde, J.A. Romijn, J.J. Emeis, L.M. Havekes, W.F. Nieuwenhuizen, Dietary sphingolipids lower plasma cholesterol and triacylglycerol and prevent liver steatosis in APOE*3Leiden mice, *Am. J. Clin. Nutr.* 84 (2006) 312–321. <https://doi.org/10.1093/ajcn/84.1.312>.
- [269] A. Parri, M. Fitó, C.F. Torres, D. Muñoz-Aguayo, H. Schröder, J.F. Cano, L. Vázquez, G. Reglero, M.-I. Covas, Alkylglycerols reduce serum complement and plasma vascular endothelial growth factor in obese individuals, *Inflammopharmacology.* 24 (2016) 127–131. <https://doi.org/10.1007/s10787-016-0265-4>.
- [270] P. Tripathi, M.K. Misra, S. Pandey, Role of L-Arginine on dyslipidemic conditions of acute myocardial infarction patients, *Indian J. Clin. Biochem.* 27 (2012) 296–299. <https://doi.org/10.1007/s12291-012-0188-9>.
- [271] E.E. Zawieja, B. Zawieja, A. Chmurzynska, Betaine Supplementation Moderately Increases Total Cholesterol Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis, *J. Diet. Suppl.* 18 (2021) 1–13. <https://doi.org/10.1080/19390211.2019.1699223>.
- [272] L. Zheng, H.-J. Cong, B. Wu, M. Xue, T. Xiang, Z.Q. Yao, W.H. Lin, HPLC-Q-TOF-MS/MS Analysis of the Constituents in the Rat Biological Fluids After Oral Administration of Qing Ru Xiao granules, *J. Chromatogr. Sci.* 53 (2015) 1562–1569.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmv058>.

7. Anexos

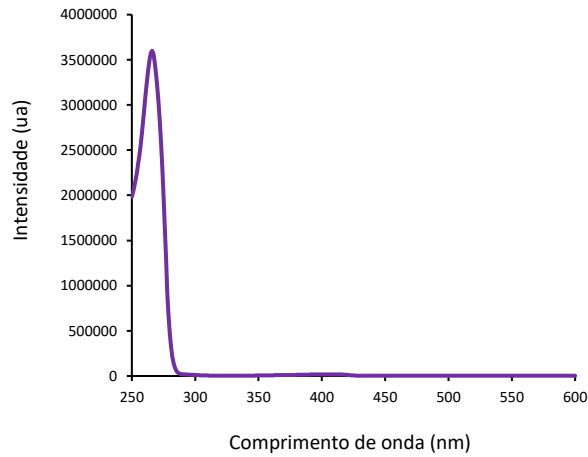


Figura Anexo 1 - Espectro UV-vis do floroglucinol, utilizado na seleção do comprimento de onda de análise.

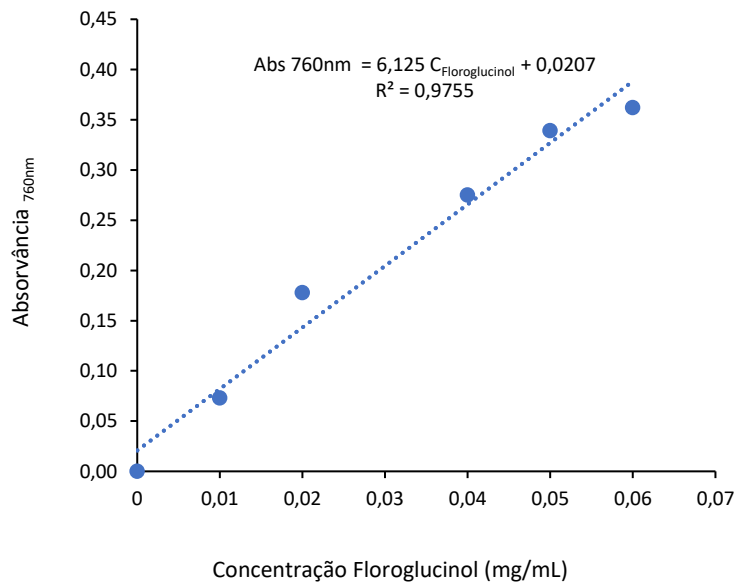


Figura Anexo 2 - Reta de calibração usada na determinação da concentração de fenóis totais presentes nos extratos de Aramé, Nori e Fucus, a 760 nm.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

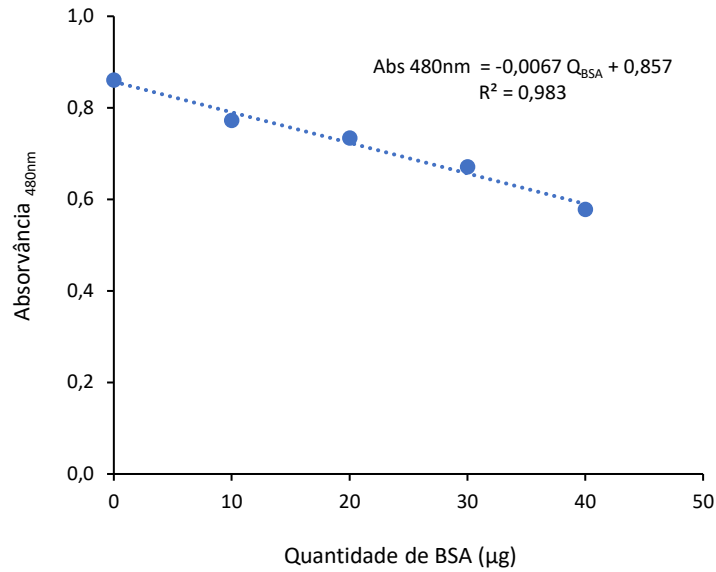


Figura Anexo 3 - Reta de calibração usada na determinação da quantidade de proteínas presentes nos extratos de Aramé, Nori e Fucus, em que existe a variação da absorvância a 480 nm corrigida com a quantidade de BSA.

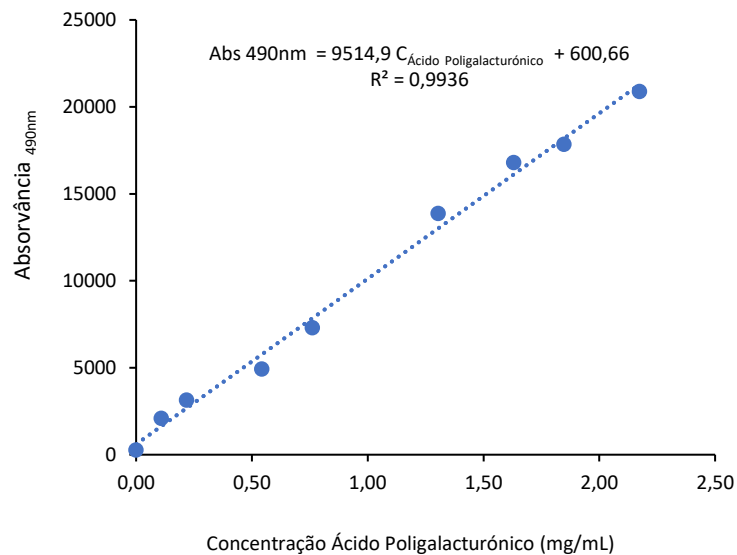


Figura Anexo 4 - Reta de calibração usada na determinação da concentração de polissacáridos totais presentes nos extratos de Aramé, Nori e Fucus, a 490 nm.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

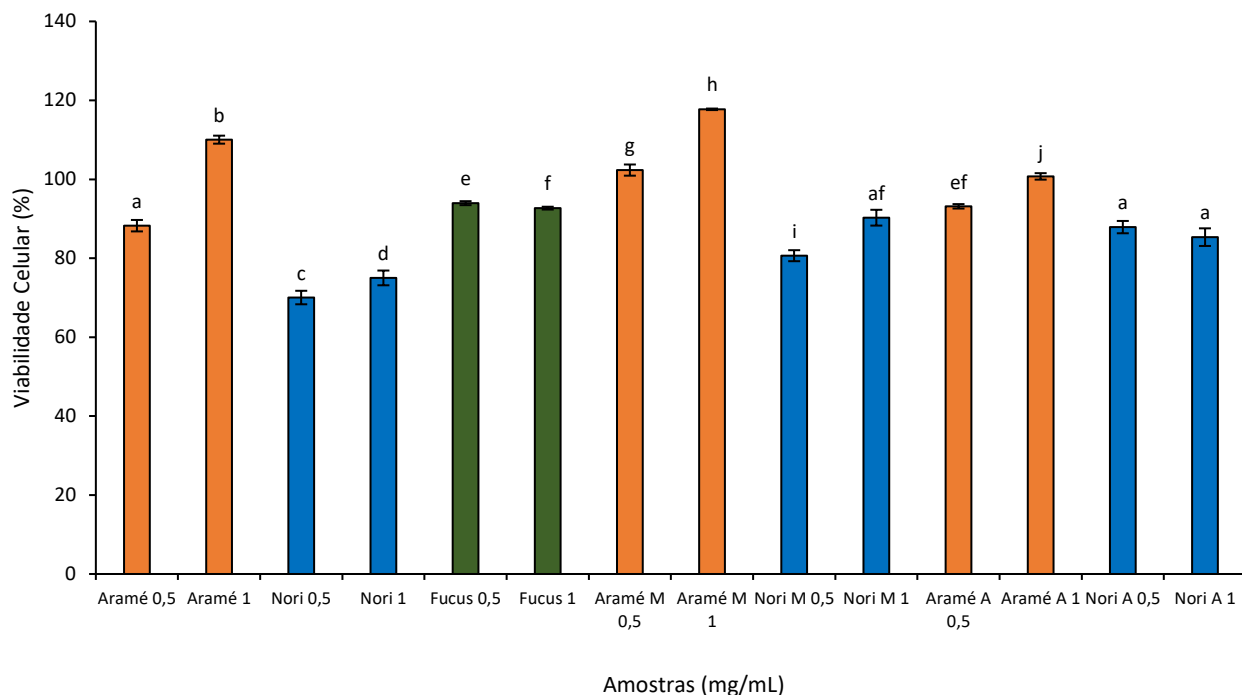


Figura Anexo 5 - Valores médios de viabilidade celular das HepG2 quando em contato com os extratos de Aramé, Nori e Fucus e frações purificadas Aramé e Nori, para as concentrações de 0,5 e 1 mg/mL, com o respetivo desvio padrão. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

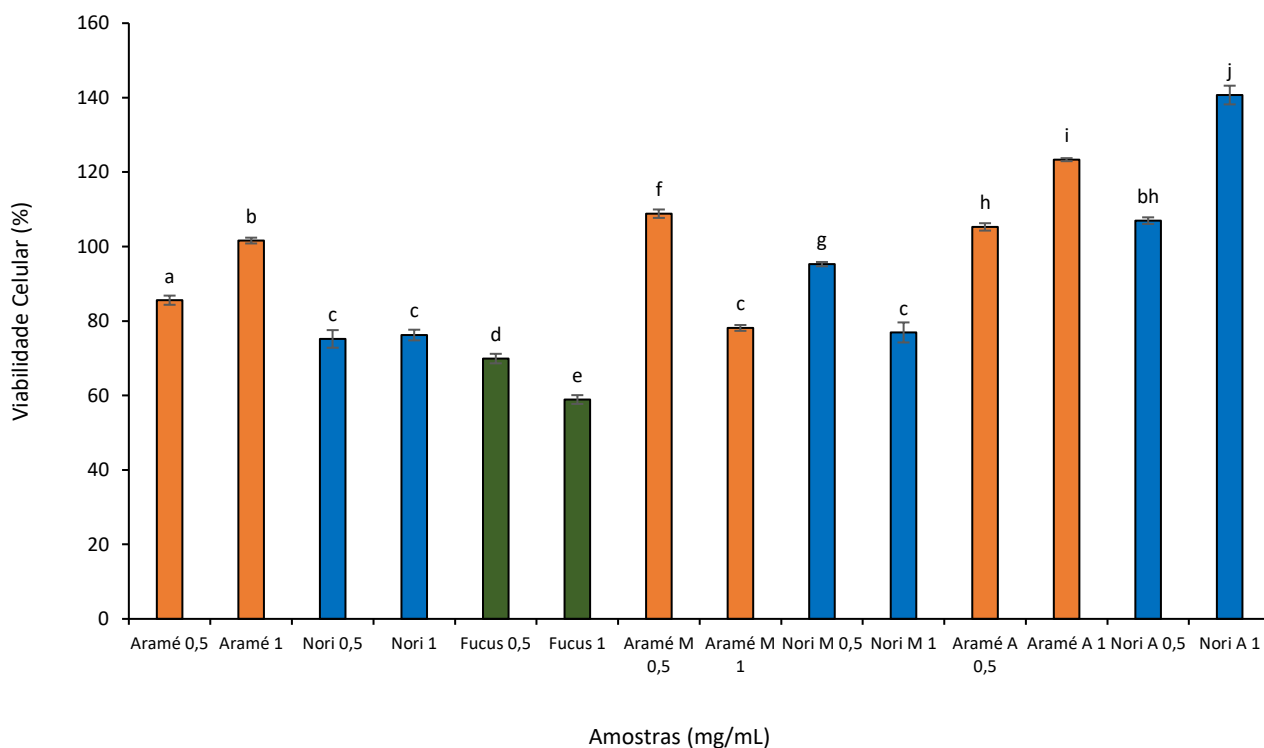


Figura Anexo 6 - Valores médios de viabilidade celular das Caco-2 quando em contato com o extrato de Aramé, Nori e Fucus e frações purificadas Aramé e Nori, para as concentrações de 0,5 e 1 mg/mL, com o respetivo desvio padrão. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

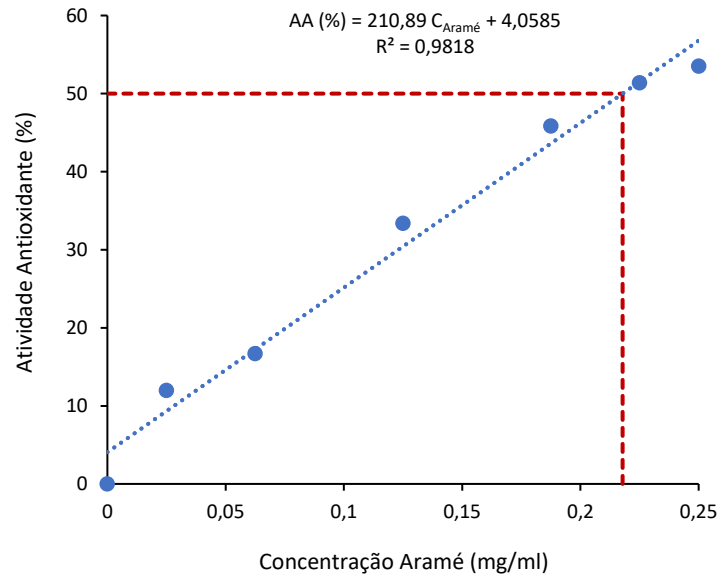


Figura Anexo 7 - Reta de calibração usada na determinação da concentração de extrato de Aramé que apresenta uma atividade antioxidante de 50% (EC₅₀), em que existe a variação da atividade antioxidante com a concentração de Aramé.

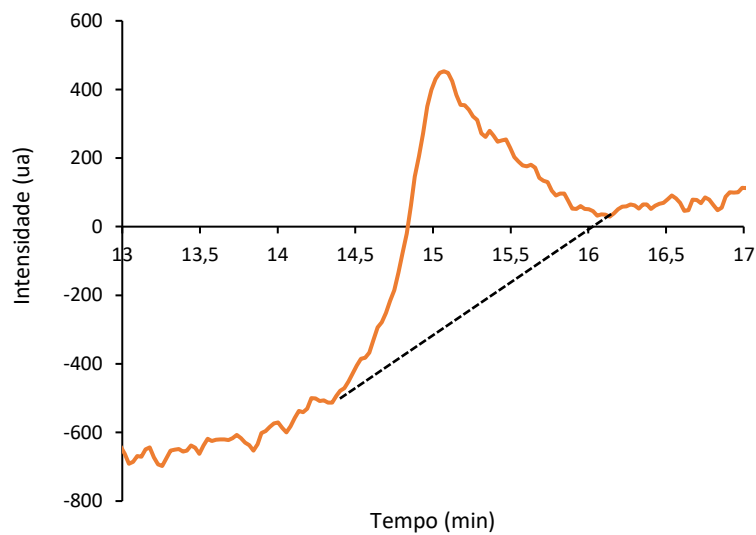


Figura Anexo 8 - Cromatograma usado na determinação da EE das NPs de BSA com 10 mg de extrato de Aramé encapsulado.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

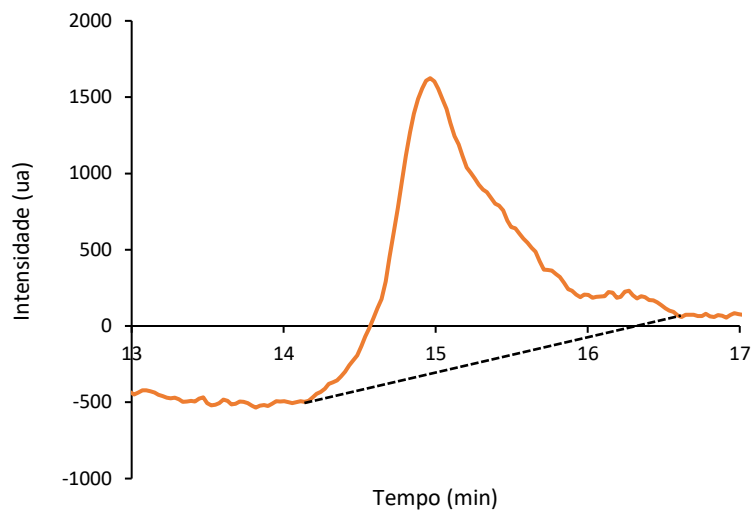


Figura Anexo 9 - Cromatograma usado na determinação da EE das NPs de BSA com 25 mg de extrato de Aramé encapsulado.

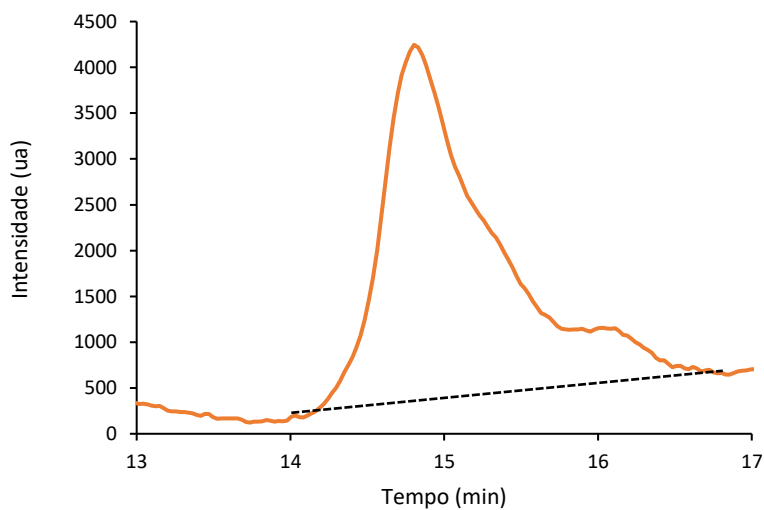


Figura Anexo 10 - Cromatograma usado na determinação da EE das NPs de BSA com 50 mg de extrato de Aramé encapsulado.

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

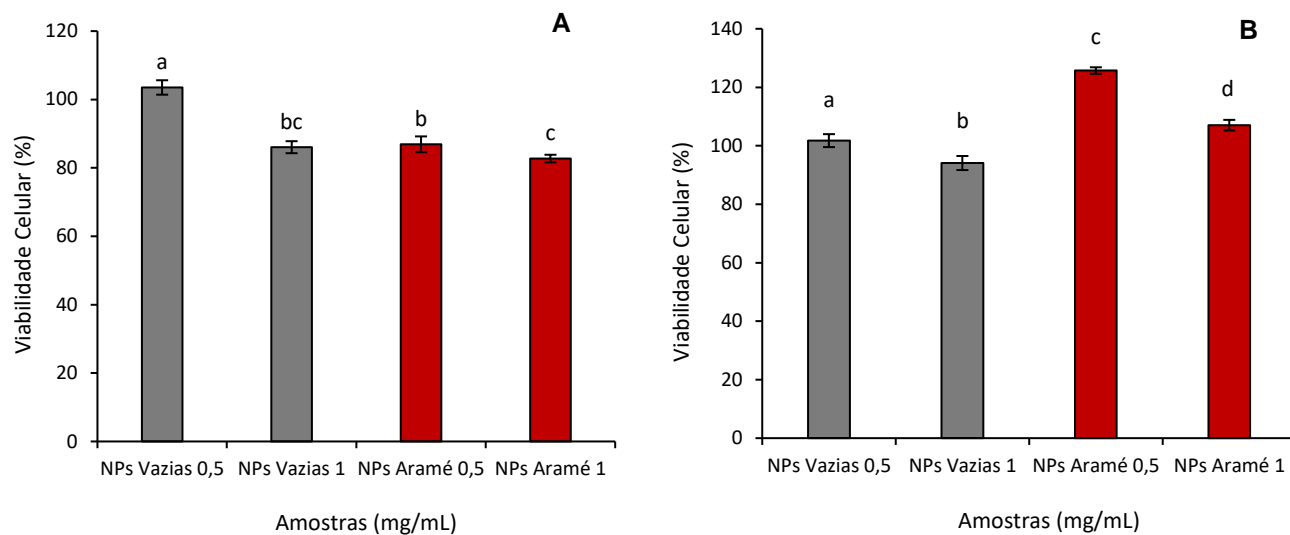


Figura Anexo 11 - Viabilidade celular das (A) Caco-2 e (B) HepG2, quando colocadas em contato com NPs vazias e NPs de Aramé, para as concentrações de 0,5 e 1 mg/mL, com o respetivo desvio padrão. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

Tabela Anexo 1 - Determinação dos principais elementos presentes na urina de cada grupo nas 5 semanas de teste,
N=negativo.

Grupo	Semana	pH	Proteína	Glucose	Densidade	Corpos Cetónicos	Urobilinogénio
Controlo	0	6,0	+15	N	1,018	± 5	++
	1	7,0	+22,5	N	1,020	± 5	+
	2	5,0	+7,5	+	1,020	± 5	+
	3	6,0	+15	N	1,018	± 10	+
	4	6,3	+30	N	1,020	± 5	++
	5	5,0	N	N	-----	-----	-----
Extrato	0	6,3	+20	N	1,020	± 10	++
	1	6,5	+20	N	1,020	± 8	+
	2	6,5	+20	N	1,020	± 8	+
	3	6,5	+15	N	1,020	± 5	N
	4	6,5	+15	N	1,020	± 2,5	+
	5	8,00	+30	N	-----	-----	-----
Ezetimiba	0	6,5	+15	N	1,018	± 5	++
	1	6	+20	N	1,018	± 5	++
	2	6	+20	N	1,018	± 5	++
	3	5,3	+22,5	N	N	± 7,5	N
	4	6,2	+20	N	1,020	± 3,3	++
	5	7	+15	N	-----	-----	-----
Extrato + Ezetimiba	0	6,7	+15	N	1,015	± 3	+
	1	6,3	+10	N	1,017	± 3	++
	2	6,3	+10	N	1,017	± 3	++
	3	6,8	+7,5	N	N	± 5	+
	4	6	+15	N	1,020	N	N
	5	7,5	N	N	-----	-----	-----

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

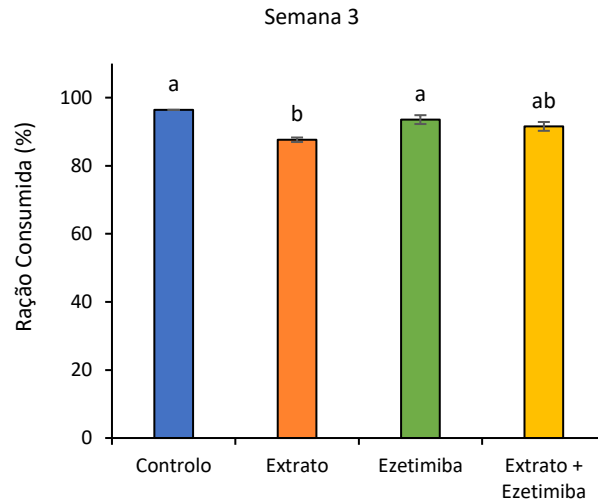


Figura Anexo 12 - Variação da ração consumida para cada grupo de teste referente ao primeiro ensaio in vivo. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

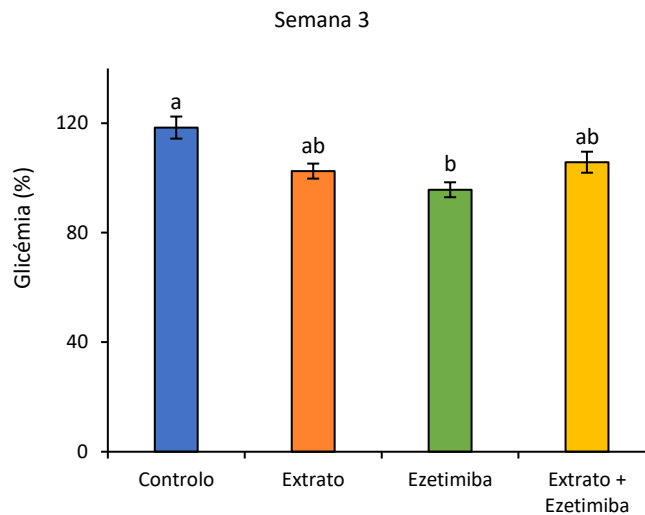


Figura Anexo 13 - Variação da glicémia para cada grupo de teste referente ao primeiro ensaio in vivo. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

Preparação e Caracterização de Decocções de Algas Marinhas Comestíveis Encapsuladas em Nanopartículas para a Redução do Risco de Doenças Cardiovasculares

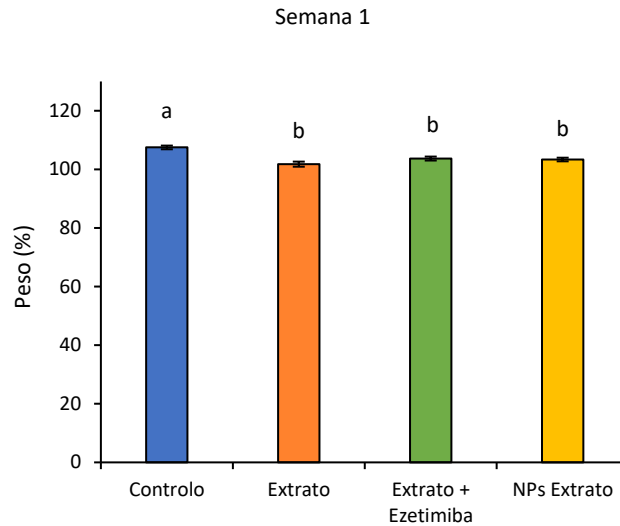


Figura Anexo 14 - Variação do peso para cada grupo de teste referente ao segundo ensaio in vivo. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).

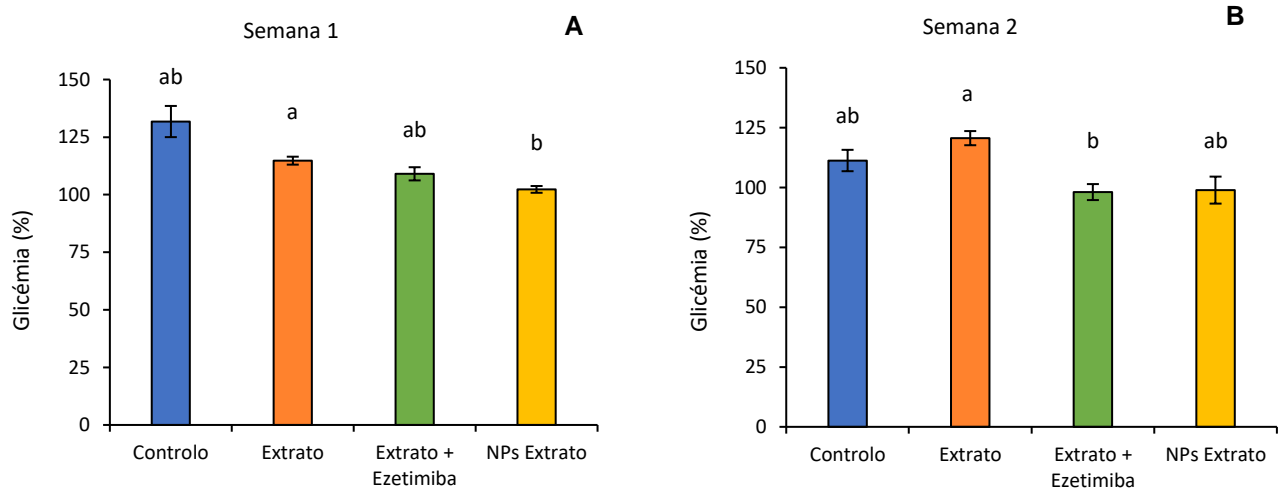


Figura Anexo 15 - Variação da glicémia para cada grupo de teste referente ao segundo ensaio in vivo. Os valores encontram-se apresentados por média relativa \pm SEM. Letras diferentes indicam uma variação significativa entre valores das diferentes amostras ($p < 0,05$).