

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA
CAMPUS ARARAQUARA – ARARAQUARA, SP

Potencial antioxidante e antiglicante de extratos de *Lemna aequinoctialis* e *Pyropia spiralis*
e desenvolvimento de um método de encapsulação utilizando Maltodextrina DE20 como
material de parede

LAURA MARIA BIGESCHI NUCCI

ARARAQUARA
2024

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA
CAMPUS ARARAQUARA – ARARAQUARA, SP

LAURA MARIA BIGESCHI NUCCI

Potencial antioxidante e antiglicante de extratos de *Lemna aequinoctialis* e *Pyropia spiralis* e desenvolvimento de um método de encapsulação utilizando Maltodextrina DE20 como material de parede

Dissertação apresentada ao Instituto de Química
– Câmpus de Araraquara da Universidade
Estadual Paulista – UNESP, como requisito
parcial para obtenção do Título de Mestre pelo
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Regildo Marcio Gonçalves da Silva

Co-orientador: Prof. Dr. Levi Pompermayer Machado

**ARARAQUARA
2024**

N962p	Nucci, Laura Maria Bigeschi Potencial antioxidante e antiglicante de extratos de <i>Lemna aequinoctialis</i> e <i>Pyropia spiralis</i> e desenvolvimento de um método de encapsulação utilizando Maltodextrina DE20 como material de parede / Laura Maria Bigeschi Nucci. -- Araraquara, 2024 69 f. : il. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara Orientador: Regildo Márcio Gonçalves da Silva Coorientador: Levi Pompemayer Machado 1. Estresse oxidativo. 2. Produtos finais de glicosilação. 3. Microencapsulação. 4. Peroxidação de lipídeos. 5. Fenóis. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

Nos estudos de extratos e compostos ativos naturais encontra-se limitações que podem interferir de maneira direta e indireta nos constituintes e na atividade biológica. Tais limitações constitui-se principalmente nas condições de preparo e formulações empregadas para produção dos extratos e compostos ativos, o que pode levar à alterações físico-química, e assim alterar a atividade biológica esperada. Diante disso o presente estudo resultou na definição de uma metodologia de imobilização e liberação de compostos ativos por meio da encapsulação dos extratos utilizando Maltodextrina DE20 como material de parede, mantendo e/ou melhorando as atividades biológicas das espécies estudadas, quanto a ação antioxidante e antiglicante. Os dados obtidos neste estudo têm impacto na elaboração de novas formulas capazes de atenderem tanto a indústria farmacêutica como a de alimentos, podendo ser base de novos e mais eficazes medicamentos e suplementos alimentares com ação sobre as doenças causadas e agravadas pelo estresse oxidativo e da glicação proteica. Sendo assim, os resultados obtidos impactam diretamente o setor industrial, de saúde humana e animal e também social, devido às diferentes abordagens e aplicabilidade do método desenvolvido no presente estudo.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

In studies of extracts and natural active compounds, we found limitations that can directly and indirectly interfere with the constituents and biological activity. Such definitions consist mainly of the preparation conditions and formulations used to produce extracts and active compounds, which can lead to physical-chemical changes, and thus alter the expected biological activity. Therefore, the present work resulted in the definition of a methodology for immobilization and release of active compounds through the encapsulation of extracts using Maltodextrin DE20 as wall material, maintaining and/or improving the biological activities of the experimental species, in terms of antioxidant action and antiglycant. The data obtained in this study have an impact on the development of new formulas capable of serving both the pharmaceutical and food industries, and could be the basis for new and more effective medicines and dietary supplements that act on diseases caused and aggravated by oxidative stress and protein glycation. Therefore, the results obtained directly impact the industrial, human and animal health and social sectors, due to the different approaches and applicability of the method developed in the present study.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Potencial antioxidante e antiglicante de extratos de *Lemna aequinoctialis* e *Pyropia spiralis* e desenvolvimento de um método de encapsulação utilizando Maltodextrina DE20 como material de parede."

AUTORA: LAURA MARIA BIGESCHI NUCCI

ORIENTADOR: REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA

COORIENTADOR: LEVI POMPERMAYER MACHADO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:

 gov.br
Documento assinado digitalmente
REGILDO MARCIO GONCALVES DA SILVA
Data: 07/02/2024 10:43:12-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. REGILDO MÁRCIO GONÇALVES DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Biotecnologia / Faculdade de Ciências e Letras do Campus de Assis da Unesp

Profa. Dra. PATRICIA SOARES SANTIAGO (Participação Virtual)
Departamento de Agronomia e Recursos Naturais / Faculdade de Ciências Agrárias do Vale do Ribeira - UNESP - Registro

Prof. Dr. PAULO EDUARDO AMARAL DEBIAGI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia Química e Ambiental / Faculdade de Ciências e Engenharia - UNNC - China

Araraquara, 05 de fevereiro de 2024

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Laura Maria Bigeschi Nucci

Nome em citações bibliográficas: Nucci, L. M. B.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Av. Dom Antonio, 2100, Parque Universitário, Assis/SP

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

Bacharel em Ciências Biológicas

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Artigos completos publicados em periódicos:

SILVA, R. M.; MARTINS, G. R.; **NUCCI, L. M. B.**; GRANERO, F. O.; FIGUEIREDO, C. C.; SANTIAGO, P. S.; SILVA, L. P. Antglycation, antioxidant, antiacne, and photoprotective activities of crude extracts and triterpene saponin fraction of *Sapindus saponaria* L. fruits: An in vitro study. Asian Pac J Trop Biomed 2022; 12:391-9. DOI: 10.4103/2221-1691.354430.

Trabalhos publicados em anais de eventos científicos:

NUCCI, L. M. B.; FIGUEIREDO, C. C. M.; MACHADO, L. P.; SILVA, R. M. G. Determinação do conteúdo de polifenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante de extratos de *Lemna aequinoctialis* (Lentilha d'água). Anais do III Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas On-line. Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente, ISSN: 2675-813X, v. 3, n. 3, 2022.

NUCCI, L. M. B.; FIGUEIREDO, C. C. M.; MACHADO, L. P.; SILVA, R. M. G. Avaliação do conteúdo de polifenóis e atividade antioxidante dos extratos de *Lemna aequinoctialis* (Lentilha d'água) e *Pyropia spiralis* (Nori do Brasil). Anais do IV Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas On-line. Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente, ISSN: 2675-813X, v. 4, n. 2, 2023, DOI 10.51189/CONBRACIB2023/18387.

Apresentação de trabalho:

NUCCI, L. M. B.; FIGUEIREDO, C. C. M.; MACHADO, L. P.; SILVA, R. M. G. Determinação do conteúdo de polifenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante de extratos de *Lemna aequinoctialis* (Lentilha d'água). III Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas On-line. 2022.

NUCCI, L. M. B.; FIGUEIREDO, C. C. M.; MACHADO, L. P.; SILVA, R. M. G. Avaliação do conteúdo de polifenóis e atividade antioxidante dos extratos de *Lemna aequinoctialis* (Lentilha d'água) e *Pyropia spiralis* (Nori do Brasil). IV Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas On-line. 2023.

NUCCI, L. M. B.; FIGUEIREDO, C. C. M.; MACHADO, L. P.; SILVA, R. M. G. Determinação de polifenóis e atividade antioxidante dos extratos e microcápsulas de *Lemna aequinoctialis* e *Pyropia spiralis*. IV Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia. 2023.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

III Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas (2022).

Congresso Biotecnologia Brasil (CBB - USP) (2022).

IV Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas (2023).

IV Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (2023).

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família por sempre me apoiarem e darem força, especialmente aos meus pais, que passaram comigo todos os momentos de dificuldade.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Regildo Márcio Gonçalves da Silva, pelo esforço, dedicação e paciência comigo, para conseguirmos desenvolver este e outros trabalhos, durante os meus anos dedicados à pesquisa científica, e pelo apoio e carinho de um amigo que Deus colocou em minha vida. Sou eternamente grata a todos ensinamentos e oportunidades que pude apreciar graças ao senhor.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Levi Pompermayer Machado, pelo apoio e suporte, durante o desenvolvimento esta pesquisa, com auxílios teóricos e disponibilização das espécies estudadas.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Célia Malagutti e Filipe Granero, por todo suporte técnico e emocional cedidos a mim durante estes dois anos.

Ao Alam, funcionário da Unesp/Assis, responsável pelo suporte e manutenção dos equipamentos do laboratório, cujo serviços possibilitam a realização de diversas pesquisas científicas.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro, por meio do processo 165734/2021-3.

Ao IEAMar (Instituto de Estudos Avançados do Mar), da cidade de São Vicente, por disponibilizar seus recursos e equipe para o desenvolvimento de parte deste projeto de pesquisa.

À Profa. Dra. Patrícia Soares Santiago, pelo suporte oferecido dentro e fora do IEAMar, e por ceder seus recursos do laboratório para realização de testes necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes, por disponibilizar seus recursos do laboratório para realização de testes necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Instituto de Química de Araraquara – UNESP, pela oportunidade, e ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia.

A todos os funcionários da Seção Técnica de Pós-graduação do Instituto de Química de Araraquara, sempre atenciosos, solícitos em todas as circunstâncias, durante esses dois anos de pesquisa.

À minha família, especialmente meus pais, por sempre estarem do meu lado.

RESUMO

Apesar dos diversos compostos bioativos serem amplamente difundidos entre as espécies vegetais, a presença e a quantidade destes dependem de fatores limitantes de preparo dos extratos, levando a modificações físico-químicas que alteram sua atividade biológica. Devido a isso, estudos de imobilização e liberação destes compostos demonstram uma tendência tecnológica utilizada para preservar as características do material vegetal, aumentando a especificidade do produto final, com a otimização da ação dos compostos em sítios alvo. Sendo assim, este estudo objetivou avaliar as atividades antioxidante e antiglicante dos extratos de *Lemna aequinocialis* (Lentilha d'água) e *Pyropia spiralis* (Nori do Brasil) pelos testes antioxidantes *in vitro* do DPPH, FRAP, NO, TBARS e ORAC, e antiglicante pela Mobilidade Relativa em Eletroforese, determinação de grupos de aminas livres e inibição da formação de AGEs. Objetivou também determinar o perfil fitoquímico dos extratos por meio da dosagem de polifenóis, flavonoides, proteínas totais e composição mineral, além de desenvolver o método de encapsulação dos extratos, tendo a maltodextrina DE20 como material de parede e caracterizar os produtos da encapsulação avaliar as atividades antioxidante e antiglicante após liberação. Ambos extratos demonstraram significativa atividade antioxidantes e antiglicante por meio dos testes avaliados. O processo de encapsulação gerou produtos encapsulados na escala nanométrica com tamanhos variados, porém, com baixo índice de polidispersão. Após a liberação as atividades antioxidantes e antiglicante mantiveram-se semelhantes às apresentadas pelos os extratos antes da encapsulação. De acordo com os resultados obtidos no estudo é possível concluir que as espécies estudadas são promissoras fontes de princípios bioativos com relevância farmacológica e/ou nutricional, principalmente com ação antioxidante e antiglicante mitigando os danos ocasionados pelo estresse oxidativo e da glicação proteica, além da presença desses metabólitos secundários, somado a outros compostos como minerais e proteínas. Os extratos destas espécies mostraram-se passíveis de serem encapsulados por maltodextrina DE20 dando origem a produtos micro e nanoestruturados que após liberação mantiveram ou mesmo aumentaram as atividades antioxidante e antiglicante avaliadas por diferentes testes *in vitro*.

Palavras Chave: Estresse oxidativo; Glicação proteica; Microcápsulas; AGEs; Peroxidação lipídica

ABSTRACT

Although several bioactive compounds are widely disseminated among plant species, their presence and quantity depend on limiting factors in extract preparation, leading to physicochemical modifications that alter their biological activity. Because of this, immobilization and release studies of these compounds demonstrate a technological trend used to preserve the characteristics of the plant material, increasing the specificity of the final product, with the optimization of the action of the compounds at target sites. Therefore, this study aimed to evaluate the antioxidant and antiglycant activities of extracts of *Lemna aequinoctialis* (Duckweed) and *Pyropia spiralis* (Nori do Brasil) by *in vitro* antioxidant tests of DPPH, FRAP, NO, TBARS and ORAC, and antiglycant by Relative Mobility in Electrophoresis, determination of free amine groups and inhibition of AGEs formation. Objective also to determine the phytochemical profile of the extracts through the dosage of polyphenols, flavonoids, total proteins and mineral composition, in addition to developing the encapsulation method of the extracts, using maltodextrin DE20 as wall material and characterizing the encapsulation products, evaluating the antioxidant and antiglycant activities after release. Both extracts demonstrated significant antioxidant and antiglycating activity through the evaluated tests. The encapsulation process generated nanometer-scale encapsulated products with varying sizes, however, with a low polydispersity index. After release, the antioxidant and antiglycating activities remained similar to those presented by the extracts before encapsulation. According to the results obtained in the study, it is possible to conclude that the species studied are promising sources of bioactive principles with pharmacological and/or nutritional relevance, mainly with antioxidant and antiglycant action, mitigating the damage caused by oxidative stress and protein glycation, in addition to the presence of these secondary metabolites, added to other compounds such as minerals and proteins. The extracts of these species were capable of being encapsulated by maltodextrin DE20, giving rise to micro and nanostructured products that, after release, maintained or even increased the antioxidant and antiglycating activities evaluated by different *in vitro* tests.

Key words: Oxidative stress; Protein glycation; Microcapsules; AGEs; Lipid peroxidation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Lemna aequinoctialis</i>	23
Figura 2 – <i>Pyropia</i> ou <i>Porphyra</i>	24
Figura 3 – Esqueleto principal de um flavonoide e suas classificações.....	26
Figura 4 - Exemplos de xantofilas à esquerda e de carotenos à direita.....	28
Figura 5 – Estrutura química de galactanas sulfatadas.....	30
Figura 6 - Medição por alterações na intensidade da fluoresceína de 0 a 90 minutos. Efeito dos diferentes extratos de <i>Lemna aequinoctialis</i> (Lentilha d'água).....	45
Figura 7 – MRE do extrato hidrometanólico de <i>L. aequinoctialis</i>	49
Figura 8 - Inibição da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) do extrato hidrometanólico de <i>L. aequinoctialis</i> por fluorescência.....	49
Figura 9 - Medição por alterações na intensidade da fluoresceína de 0 a 90 minutos. Efeito de diferentes concentrações de extratos de <i>Pyropia spiralis</i> (Nori do Brasil).....	53
Figura 10 – MRE do extrato aquoso de <i>Pyropia spiralis</i>	55
Figura 11 - Inibição da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) do extrato aquoso de <i>Pyropia spiralis</i> por fluorescência.....	56
Figura 12 - Diâmetro hidrodinâmico de microcápsula de <i>Lemna aequinoctialis</i> (0,001 g/ml) em tampão fosfato 20 mmol/L pH 7,0 obtido por DLS e analisado pela intensidade de espalhamento das partículas.....	60
Figura 13 - Diâmetro hidrodinâmico de microcápsula de <i>Pyropia spiralis</i> (0,001 g/mL) em tampão fosfato 20 mmol/L pH 7,0 obtido por DLS e analisado pela intensidade de espalhamento das partículas.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade antioxidante (DPPH e FRAP) do extrato metanólico de <i>L. aequinoctialis</i>	43
Tabela 2 – Atividade antioxidante (DPPH e FRAP) do extrato hidrometanólico de <i>L. aequinoctialis</i>	43
Tabela 3 – Atividade antioxidante (DPPH e FRAP) do extrato aquoso de <i>L. aequinoctialis</i>	43
Tabela 4 – Atividade antioxidante (NO e TBARS) do extrato hidrometanólico de <i>L. aequinoctialis</i>	44
Tabela 5 – Atividade antioxidante (NO e TBARS) do extrato aquoso de <i>L. aequinoctialis</i>	44
Tabela 6 – Atividade antioxidante (NO e TBARS) do extrato metanólico de <i>L. aequinoctialis</i>	44
Tabela 7 – Determinação dos teores totais de fenóis e flavonoides no extrato metanólico de <i>L. aequinoctialis</i>	46
Tabela 8 – Determinação dos teores totais de fenóis e flavonoides no extrato aquoso de <i>L. aequinoctialis</i>	46
Tabela 9 – Determinação dos teores totais de fenóis e flavonoides no extrato hidrometanólico de <i>L. aequinoctialis</i>	47
Tabela 10 – Composição mineral e proteínas totais de <i>Lemna aequinoctialis</i> e <i>Pyropia spiralis</i>	48
Tabela 11 – Atividade antioxidante (DPPH e FRAP) e fenóis totais do extrato metanólico de <i>Pyropia spiralis</i>	50
Tabela 12 – Atividade antioxidante (DPPH e FRAP) e fenóis totais do extrato hidrometanólico de <i>Pyropia spiralis</i>	50
Tabela 13 – Atividade antioxidante (DPPH e FRAP) e fenóis totais do extrato aquoso de <i>Pyropia spiralis</i>	51
Tabela 14 – Atividade antioxidante (NO e TBARS) do extrato aquoso de <i>Pyropia spiralis</i>	52
Tabela 15 – Atividade antioxidante (NO e TBARS) do extrato hidrometanólico de <i>Pyropia spiralis</i>	52
Tabela 16 – Determinação dos teores totais de fenóis e flavonoides no extrato aquoso de <i>Pyropia spiralis</i>	54

Tabela 17 – Determinação dos teores totais de fenóis e flavonoides no extrato hidrometanólico de <i>Pyropia spiralis</i>	54
Tabela 18 - Eficiência de encapsulação dos extratos hidrometanólico de <i>Lemna aequinoctialis</i> e aquoso de <i>Pyropia spiralis</i> por determinação de polifenóis totais.....	57
Tabela 19 - Determinação da atividade antioxidante por meio dos testes DPPH e FRAP dos extratos hidrometanólico de <i>Lemna aequinoctialis</i> e aquoso de <i>Pyropia spiralis</i> encapsulado e após a liberação das microcápsulas.....	58
Tabela 20 - Quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides das microcápsulas produzidas com os extratos hidrometanólico de <i>Lemna aequinoctialis</i> e aquoso de <i>Pyropia spiralis</i>	58
Tabela 21 . Média de 20 medidas de DLS analisadas para a <i>Lemna aequinoctialis</i> (0,001 g/ml) extraídos diretamente do software do DLS.....	61
Tabela 22 . Média de 20 medidas de DLS analisadas para a <i>Pyropia spiralis</i> (0,001 g/mL) extraídos diretamente do software do DLS.....	62

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AAPH - 2,2'-azobis-2-amidinopropano
AGEs – produtos finais de glicação avançada
AIMT – aquicultura integral multitrófica
AGE – ácido gálico equivalente
 AlCl_3 – cloreto de alumínio
AMG – aminoguanidina
BSA – albumina serica bovina
DE – dextrose equivalente
Dh – diâmetro hidrodinâmico
DMAPP – dimetilalil difosfato
DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EROs – espécies reativas de oxigênio
ET – trolox equivalente
 FeCl_3 – cloreto férrico
FRAP – potencial antioxidante de redução do ferro
G – giro
HCl – ácido clorídrico
Hz – hertz
IC50 – concentração necessária para inibir 50%
IPP – isopentenil pirofosfato
MAAs – aminoácidos de micospolina
mA – miliampere
mg – miligrama
mL – mililitros
mM – milimolar
MRE – mobilidade relativa em eletroforese
 Na_2CO_3 – carbonato de sódio
 NaNO_2 – nitrito de sódio
nm – nanômetro
NaOH – hidróxido de sódio
NO – óxido nítrico
NPS – nitroprussiato de sódio
OPA - orto-ftaldialdeído

ORAC-FL – Capacidade de absorção de radicais de oxigênio, por fluorescência

pH – Potencial hidrogeniônico

PS - polissacarídeos sulfatados

RAGEs – receptor de produtos de glicação avançada

RE – rutina equivalente

rpm – rotação por minuto

SDS – dodecilsulfato de sódio

ST – sólidos totais

TBARS – espécies reativas do ácido tiobarbitúrico

TPTZ - Fe³⁺/tripiridiltriazina

UV – ultravioleta

UV-Vis – ultravioleta visível

μL - microlitro

μM – micromolar

μm – micrometro

LISTA DE SÍMBOLOS

λ - comprimento de onda

% - porcentagem

x – vezes

°C – Grau Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1. Estresse oxidativo.....	19
2.2. Glicação proteica.....	21
2.3. Plantas aquáticas.....	22
2.3.1. <i>Lemna aequinoctialis</i>	23
2.3.2. <i>Pyropia spiralis</i>	24
2.4. Compostos com ação antioxidante.....	26
2.4.1. Flavonoides.....	26
2.4.2. Carotenoides.....	27
2.4.3. Polissacarídeos.....	29
2.5. Microencapsulação.....	30
3. OBJETIVOS.....	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1. Obtenção do material vegetal.....	32
4.2. Obtenção dos extratos.....	33
4.3. Determinação da atividade antioxidante.....	33
4.3.1. Atividade sequestradora do radical DPPH.....	33
4.3.2. Atividade antioxidante pelo método FRAP.....	34
4.3.3. Atividade sequestradora de óxido nítrico (NO).....	34
4.3.4. Inibição da peroxidação lipídica (TBARS).....	35
4.3.5. Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC-FL).....	35
4.4. Determinação da atividade antiglicante.....	36
4.4.1. Determinação de grupos de aminas livres.....	36
4.4.2. Inibição da Formação de AGEs.....	36
4.4.3. Mobilidade relativa em eletroforese (MRE).....	37
4.5. Microencapsulação.....	38
4.5.1. Microencapsulação dos extratos em Maltodextrina.....	38
4.5.2. Avaliação das microcápsulas.....	38
4.5.2.1. Eficiência da encapsulação de acordo com compostos fenólicos (%).....	38
4.5.2.2. Ruptura das micropartículas para liberação dos compostos.....	39
4.5.2.3. Caracterização físico-química e estabilidade.....	39
4.5.2.3.1. Análise Macroscópica.....	39

4.5.2.3.2. Determinação do diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão (IPD) e Potencial Zeta.....	39
4.5.3. Análises fitoquímicas dos extratos e compostos liberados pelas microcápsulas...	40
4.5.3.1. Determinação de polifenóis totais.....	40
4.5.3.2. Determinação de flavonoides totais.....	40
4.5.3.3. Determinação do teor de proteínas totais.....	41
4.5.3.4. Determinação de composição mineral.....	41
4.6. Análise Estatística.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1. Resultados obtidos com extrato bruto das espécies.....	41
5.1.1. <i>Lemna aequinoctialis</i>	42
5.1.2. <i>Pyropia spiralis</i>	49
5.2. Resultados após a encapsulação dos extratos.....	56
5.3. Caracterização das microcápsulas.....	59
5.3.1. <i>Lemna aequinoctialis</i>	59
5.3.2. <i>Pyropia spiralis</i>	61
6. Conclusão.....	62
REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo baseia-se num estado de desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a capacidade antioxidante endógena, ou seja, átomos, íons ou moléculas que contêm oxigênio com um elétron não pareado em sua órbita externa, devido portar grande instabilidade e elevada reatividade, tendem a ligar este elétron com outros presentes em estruturas próximas de sua formação, podendo reagir e modificar irreversivelmente macromoléculas biológicas, como DNA, proteínas, carboidratos e lipídeos o que leva células a apoptose (SIES et al., 2005; BARBOSA et al., 2010). Em condições patológicas, onde a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio ultrapassa o nível de defesa antioxidante, este desequilíbrio contribui tanto no processo de envelhecimento, como também no desenvolvimento de complicações biológicas, incluindo inflamação crônica, doenças neurodegenerativas, diabetes e até mesmo o câncer (ROESLER et al., 2007; KAMMEYER e LUITEN, 2015).

No que diz respeito à origem dos radicais livres há os de fonte endógena, os quais são produzidos pelo metabolismo normal e também os de fonte exógena, que são devidos, principalmente, a má alimentação, poluentes ambientais e radiação solar (AMES et al., 1993; DREHER e JUNOD, 1996; TROUBA et al., 2002; ROESLER et al., 2007). Pesquisas demonstram que antioxidantes de origem vegetal têm muita importância nesse contexto, com destaque para compostos fenólicos e proteicos, reduzindo ou até mesmo eliminando os efeitos deletérios dos processos oxidativos, podendo assim ser intensivamente empregados na indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética (BIANCHI e ANTUNES, 1999; ROESLER et al., 2007).

Outro processo altamente lesivo à saúde e, associado a altas concentrações de radicais livres é a glicação, caracterizada pela reação não enzimática entre açúcares redutores e proteínas, conhecida como reação de Maillard. O resultado final da glicação é uma classe de compostos modificados denominados produtos de glicação avançada (AGEs), dos quais o mecanismo fisiopatológico se dá por sua capacidade modificadora de propriedades químicas e morfofuncionais de estruturas biológicas como proteínas e de tecidos por meio de ligações cruzada inter e intramolecular, favorecendo a formação de radicais livres e indução de resposta inflamatória após ligação com receptores específicos, os RAGEs (Receptor de Produtos da Glicação Avançada), presentes na membrana celular. Nesse contexto, estão relacionados a alterações do nível de citocinas, hormônios e

complicações mais sérias como cataratas, retinopatia, nefropatias e especialmente doenças vasculares (HELLWIG et al., 2014).

Diversos estudos têm mostrado que os danos causados às células pela ação de radicais livres estão relacionados ao surgimento e agravamento de diversas doenças, sendo a principal delas o câncer. O processo de glicação de biomoléculas é outro importante fator relacionado ao dano celular, que além de atuar na formação de AGEs, ainda contribuem para produção e aumento de radicais livres, resultando principalmente no estresse oxidativo e no envelhecimento precoce. Diante disso, torna-se necessário um estudo da potencialidade farmacológica, cosmético e alimentício das diferentes plantas aquáticas e algas com poucas comprovações científicas, podendo resultar na descoberta de novos compostos ativos passíveis de ser empregados na terapia e/ou prevenção de diferentes doenças, principalmente com atividade antioxidante e antiglicante.

Considerando a necessidade premente do estudo de novos compostos naturais que apresentem amplo aspecto de atividade antioxidante e antiglicante, umas das opções para obtenção destes compostos está no estudo de plantas aquáticas e macroalgas marinhas, podendo ser fonte de produtos alimentícios, cosméticos, farmacêuticos, agrícolas e até biocombustíveis (CORNISH; GARBARY, 2010 e GHADIRYANFAR et al., 2016).

Assim o estudo sobre os extratos de *Lemna aequinoctialis* e *Pyropia spiralis*, para avaliar seu potencial antioxidante e sua atividade antiglicante, considerando a possível microencapsulação de seus compostos, pode contribuir de forma significativa e fundamental para se estabelecer uma forma de imobilização e liberação de ativos presentes nos extratos mantendo as atividades antioxidante e antiglicante exercidas pelos componentes ativos presentes nos mesmos, permitindo assim o aumento das informações científicas para a utilização desta espécie nas diferentes áreas da indústria.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Estresse Oxidativo

Um quadro de estresse oxidativo é desenvolvido a partir do desequilíbrio entre a produção natural de espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua captura por moléculas de potencial antioxidante, que interagem com os radicais livres, impedindo que estes se liguem à outras moléculas, essenciais para o funcionamento do organismo. É comum que haja uma associação direto entre os radicais livres e seus efeitos danosos a saúde humana,

porém, a produção dessas moléculas é de extrema importância para algumas reações bioquímicas do metabolismo, como a geração de energia em forma de ATP, onde esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons durante a respiração celular, além de possibilitarem a ativação de genes no DNA e auxiliar nos mecanismos de defesa contra um processo de infecção (BARBOSA et al., 2010).

O radical livre se trata de uma molécula altamente reativa por possuir elétrons desemparelhados na sua camada de valência, sendo formado por reações de oxido-redução, uma vez que precisam ser oxidados, doando um elétron, ou reduzidos, recebendo um elétron, podendo então ser resultado desse tipo de reação, ou então ser o fator inicial para provocar esta reação (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Os EROs são moléculas geradas por processos metabólicos, principalmente pela respiração nas mitocôndrias, onde o oxigênio molecular (O_2) é reduzido pela enzima citocromo oxidase para formar moléculas de água, porém, mesmo que a ação desta enzima seja controlada para impedir o acúmulo de radicais, cerca de 5% do oxigênio metabolizado nas mitocôndrias acabam sendo desviados para outras vias metabólicas, dando origem aos radicais livres superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxila ($OH^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (BARBOSA et al., 2010).

Os metais ferro e cobre apresentam influência no processo de formação de radicais livres por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, porém, o ferro se caracteriza como mais ativo por estar presente em maior abundância no organismo, estando biologicamente mais capacitado a participar de reações de oxido-redução de biomoléculas, quando está em seu estado dissociado (FERREIRA e MATSUBARA, 1997). Além disso, outra fonte geradora de radicais livres são as enzimas NADPH oxidases, encontradas nas membranas celulares, sendo responsáveis pela transferência de elétrons, gerando radicais superóxidos por terem como receptor final de elétrons o oxigênio molecular (BARBOSA et al., 2010).

A alta taxa de produção destes radicais, sem que haja uma estabilização de sua reatividade pelos antioxidantes, leva aos danos oxidativos causados pelo acúmulo dessas moléculas. Este desequilíbrio gera um estresse oxidativo devido à interação dos EROs com outras moléculas funcionais e também com as membranas plasmáticas das células, sendo esta a mais atingida pelo processo de peroxidação lipídica, apresentando um grande potencial de geração de radicais livres, como a alcoxila ($LO^{\cdot-}$) e a peroxila ($LO_2^{\cdot-}$), devido aos seus ácidos graxos poli-insaturados (BARBOSA et al., 2010). Além disso, a lipoperoxidação pode causar alterações na estrutura e na permeabilidade dessas membranas, e gerar também produtos citotóxicos, como o malonaldeído, levando a morte celular (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

2.2 Glicação proteica

Uma interação entre um açúcar redutor e uma proteína por meio de uma reação não-enzimática, chamada de reação de Maillard, é conhecida como processo de glicação. Este processo tem como resultado a formação de radicais denominados de produtos final de glicação avançada (AGEs) que são capazes de modificar as estruturas morfofuncionais de moléculas, causando a perda de sua função (HELLWIG et al., 2014). As reações de Maillard podem ser divididas em três estágios, onde o estágio inicial é caracterizado pela condensação do grupo carbonila do açúcar com um grupamento amino livre de aminoácidos, peptídeos e proteínas, dando início a reação. Essa condensação leva a modificações que geram estruturas chamadas de base de Schiff, que, por serem moléculas instáveis, acabam passando por rearranjos estruturais dando origem a moléculas de aminocetoses pouco estáveis, chamadas de produtos de Amadori, ou produtos de Heyns, dependendo do tipo de açúcar que foi iniciada a reação. Estes produtos são fragmentados, originando reações de desidratação, enolização e retroaldolização, produzindo compostos dicarbonílicos, derivados de furfural, redutonas e derivados de Strecker (vindos da degradação de aminoácidos), sendo estes cíclicos e extremamente reativos, caracterizando o estágio intermediário, que se finaliza com estes produtos interagindo com resíduos de lisina e argenina de proteínas (FRANCISQUINI et al., 2017; SHIBAO e BASTOS, 2011).

A reação de Maillard pode ocorrer em alimentos e em organismos vivos, originando compostos que são responsáveis por dar aroma, sabor e cor ao alimento, podendo ser benéficos com a inclusão destes na alimentação, pois podem apresentar atividade antioxidante, antimutagênica e quimioprotetora, porém, em excesso essa reação pode gerar os produtos de glicação avançada (AGEs) tóxicos para o organismo, como a acroleínas, e aminas heterocíclicas, levando ao comprometimento de aminoácidos essenciais, especialmente a lisina, estando associados a perda de funcionalidade de tecidos e ao envelhecimento, gerando doenças como a catarata e a aterosclerose (BASTOS et al., 2011; SHIBAO e BASTOS, 2011).

No organismo, os processos de glicólise e autooxidação da glicose, geram compostos dicarbonílicos que podem ser até 20 mil vezes mais reativos que a glicose, como o metilglioxal e o glioxal, interagindo com aminoácidos para produzir seus produtos finais de glicação, sendo que este processo é aumentado em estado de hiperglicemia em tecidos

independentes de insulina, pois a glicose pode se acumular e se ligar as proteínas presentes nestes tecidos, causando a perda de sua função (SHIBAO e BASTOS, 2011).

Existem alguns fatores que influenciam na reação de Maillard, como o pH e a temperatura, onde temperaturas acima de 40°C e pH mais alcalino levam a um aumento significativo na velocidade de reação, porém o tipo de amina e de açúcar também são fatores limitantes para que aconteça o processo de glicação. Os açúcares do tipo pentose são mais reativos do que as hexoses que são mais reativas que os dissacarídeos, sendo que os açúcares característicos para o aumento da velocidade da reação são os xiloses, seguidos de arabinoses, glicose, maltose, e frutose, além de que o tipo de açúcar que será glicado vai interferir no tipo de produto gerado no final da reação, onde as cetoses costumam gerar produtos de Heyns e as aldoses geram produtos de Amadori. Enquanto que, em relação às aminas, a lisina pode ser até 3 vezes mais reativa que outros aminoácidos, pois apresentam um grupamento α e ϵ -amino em sua estrutura, classificada juntamente com a glicina, o triptofano e a tirosina, que também possuem uma alta reatividade, porém, outros aminoácidos, com características alcalinas e apolares, como a arginina, a fenilalanina, leucina, isoleucina e valina, apresentam uma reatividade moderada com os açúcares redutores, seguidos do ácido glutâmico e do ácido aspártico, sendo que a cisteína, por ser um aminoácido sulfurado, apresenta menos reatividade (FRANCISQUINI et al., 2017; SHIBAO e BASTOS, 2011).

2.3 Plantas aquáticas

As plantas aquáticas, principalmente as algas marinhas, são organismos utilizados como matéria-prima de produtos como medicamentos, combustíveis, cosméticos, biorremediadores, além de servirem como alimento animal e humano. Particularmente as algas, podem ser empregadas na fabricação de medicamentos, de cosméticos e na indústria alimentícia. Nesta última, estas servem de alimento como os sushis, substâncias espessantes e estabilizantes em sorvetes, doces e derivados como o ágar-ágar e as carragenanas, ambos produzidos pelas algas vermelhas. Neste contexto, estas plantas apresentam potencial de comercialização para consumo humano, devido ao seu valor nutricional, mas carece ainda de estudos e elucidação de novas aplicações na saúde humana e animal, pois a falta de conhecimento impede a exploração de todo seu potencial (AASIN et al., 2018; POOJA et al., 2020).

2.3.1 *Lemna aequinoctialis*

Pertencente à família *Lemnaceae*, classificadas em 5 gêneros (*Spirodela*, *Landoltia*, *Lemna*, *Wolffiella* e *Wolffia*), a *Lemna* sp. L. (Araceae), popularmente conhecida como lentilha-d'água ou “duckweed” (erva-de-pato) é uma planta aquática (Figura 1) de extrema facilidade de adaptação, podendo crescer em condições limitadas de nutrientes, e em ambientes com alta variação de temperatura e pH (LIU et al., 2020). Estas são caracterizadas por serem plantas de pequeno porte, verdes e presentes em água doce (OLORUNFEMI et al., 2006), e em condições ideais, essas plantas crescem rapidamente, produzindo grandes quantidades de biomassa, o que eleva seu teor de aminoácidos, ácidos graxos e amido (APPENROTH et al., 2017; LIU et al., 2020).

Figura 1 – *Lemna aequinoctialis*



Pensando em um cenário para redução dos danos causados pelo uso indiscriminado de agentes controladores na agricultura, estudos vêm mostrando que *L. aequinoctialis* tem capacidade fitorremediadora da poluição de águas residuais agrícolas, diminuindo os efeitos da eutrofização causados pelo acúmulo de fertilizantes (LIU et al., 2020), além de terem potencial de bioacumular metais pesados descartados junto com os resíduos industriais e municipais (BOKHARI et al., 2015; HOU et al., 2007; RAZINGER et al., 2007; SALLAH-UD-DIN et al., 2017). Esta espécie também apresenta uma utilização promissora em relação a produção de bioenergia, em função de sua alta produtividade de biomassa, possuir grandes quantidade de carboidratos e pouca lignina em sua composição fitoquímica, esta planta carrega um grande potencial como matéria-prima para geração de produtos como biogás (metano e hidrogênio) e biocombustíveis (LIU et al., 2020).

Devido ao seu alto teor de proteínas e aminoácidos essenciais, a *L. aequinoctialis* se faz uma alternativa mais sustentável para o consumo de proteínas, que hoje provem da produção de gado de corte, provocando um impacto drástico no meio ambiente, por isso seu valor nutricional, pode servir de uma fonte de proteína de qualidade, tanto para uso como ingredientes para rações, como para uso humano no futuro (OLANIYI e OLADUNJOYE, 2012; ALI et al., 2014; LIU et al., 2020). Outros estudos relatam diversas ações biológicas desta espécie como sua atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica (GÜLÇİN et al., 2010), e presença de uma variedade de compostos fenólicos, principalmente flavonoides (PAGLIUSO et al., 2020), reforçando que a planta é uma fonte promissora de antioxidantes alimentares naturais.

2.3.2 *Pyropia spiralis*

Já entre as macroalgas marinhas, o gênero *Porphyra* ou *Pyropia* (Figura 2) é classificado em mais de 75 espécies em todo o mundo, podendo ser encontradas desde regiões temperadas (frias) até regiões tropicais (quente) como no Brasil (MILSTEIN et al., 2014), são popularmente conhecidas como nori, e seu cultivo ocorre principalmente no Japão, Coreia e China (BITO e WATANABE, 2017). Dentre as espécies das macroalgas vermelhas deste gênero, a *Pyropia spiralis* E.C.Oliveira & Coll (Bangiaceae, Rodophyta) é uma espécie nativa, encontrada na costa brasileira (MILSTEIN et al., 2014). A nori é consumida especialmente na forma de sushi, mas também pode ser utilizada em sopas e misturada no pão. São espécies ricas em nutrientes, inclusive vitamina B12, que é ausente na maioria dos alimentos vegetais (WATANABE et al., 2014).

Figura 2 – *Pyropia* ou *Porphyra*



Esta espécie é encontrada em regiões da costa brasileira, conhecidas como zona interdital (URREA-VICTORIA et al., 2022), caracterizadas por ser uma zona de transição entre o ambiente terrestre e marinho, onde os seres vivos que habitam essa região estão sujeitos a imersão pela água, quando a maré está alta, e emersão, com a maré baixa. Por ser um organismo sésil, e estar presente neste ambiente hostil, esta espécie precisa de mecanismos adaptativos de defesa contra o estresse ambiental. Estudos anteriores mostram que os mecanismos de ação antioxidante dessa alga estão intimamente ligados à sua tolerância contra as altas variações de temperatura e radiação UV, além da dessecação e esgotamento de nutrientes durante o período de emersão (URREA-VICTORIA et al., 2022). As algas marinhas podem apresentar diferentes mecanismos de respostas aos estresses ambientais, sendo que a alteração no conteúdo de pigmentos é um dos sistemas principais para esta espécie, onde os carotenoides atuam como agentes antioxidantes ao sequestrar moléculas de clorofila singleto e tripleto formados durante a fotossíntese (TALA & CHOW, 2014).

Outro mecanismo presente no metabolismo de algas marinhas, em resposta ao estresse, é a produção de metabolitos secundários, como os aminoácidos de micosporina (MAAs), que atuam na proteção celular, como bloqueadores químicos da radiação UV e agentes antioxidantes, tanto no sequestro de radicais livres, quanto na inibição da peroxidação lipídica (SUN et al., 2020), além de outros metabólitos como os compostos fenólicos e poliaminas (TALA & CHOW, 2014).

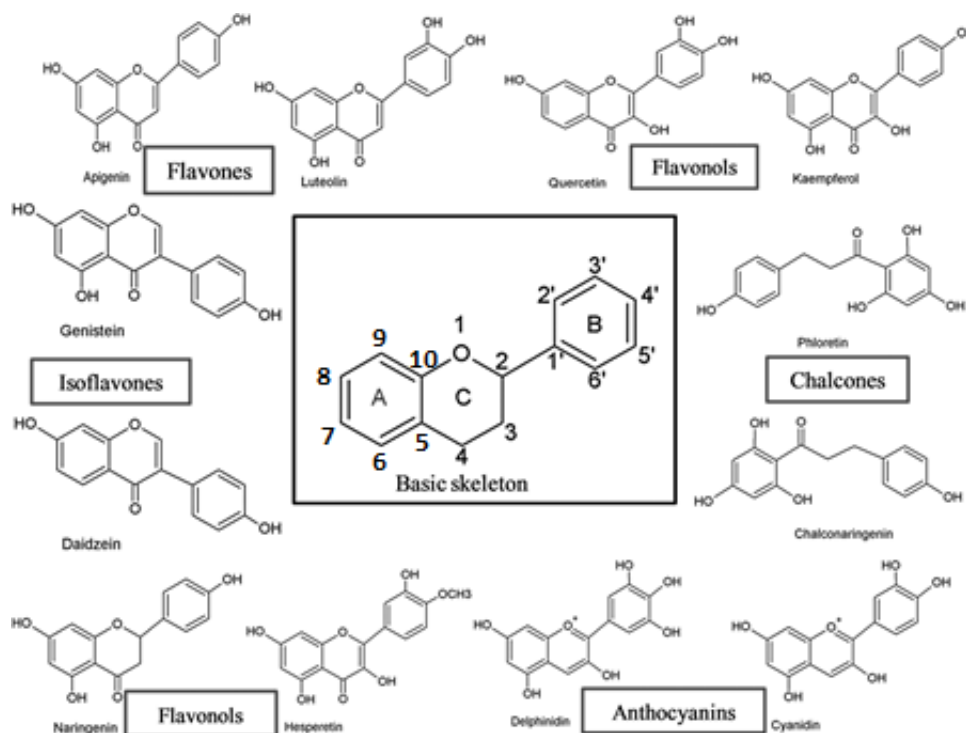
Um bioativo das algas marinhas que também é bastante estudado são os polissacarídeos sulfatados, que se destacam pelas respostas antioxidantes (ZHANG et al., 2003), antitumorais (YU et al., 2015) e imunorregulatórias (BHATIA et al., 2013). Moreira e colaboradores (2010) também observaram um efeito hipocolesterolêmico de nori em ratos Wistar. Adicionalmente, trabalhos investigando o potencial antimutagênico de extratos de algumas algas comestíveis revelaram o efeito quimioprotetor dos seus compostos (OKAI et al., 1996; OSUNA-RUIZ et al., 2016). Estes estudos sobre as diversas espécies do gênero *Pyropia* relatam quantos benefícios podem ser atribuídos com o consumo de algas, o que pode contribuir significativamente para o desenvolvimento da algicultura e reforçar seu uso para consumo humano (ISAKA et al., 2015; ISHIHARA et al., 2005; MARQUES et al., 2018).

2.4 Compostos com ação antioxidante

2.4.1 Flavonoides

Os flavonoides são um grupo de metabólitos secundários, dentro dos compostos fenólicos, que são gerados a partir das variações do ácido cinâmico, com três unidades de acetato, formando um esqueleto químico de 16 carbonos, sendo distribuídos em dois anéis fenil e um heterocíclico (C6-C4-C6) (Figura 3) (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016). Esse grupo de moléculas podem ser classificados pelas diferentes substituições do anel central de sua estrutura, e também pelo grau de insaturação, sendo as principais classes de flavonoides as flavonas, os flavonóis, os flavanonois, as flavanonas, os isoflavonóides e as antocianinas (PAGLIUSO et al., 2020). Sendo que os flavonoides que apresentam uma substituição por um anel di-hidroxil, causada pela resposta à algum estresse ambiental, possuem uma grande capacidade de inibir a formação de espécies reativas de oxigênio, além de reduzir os níveis de radical livres já formados, demonstrando um grande potencial antioxidante (PASHAEI, 2016).

Figura 3 – Esqueleto principal de um flavonoide e suas classificações



Fonte: (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016)

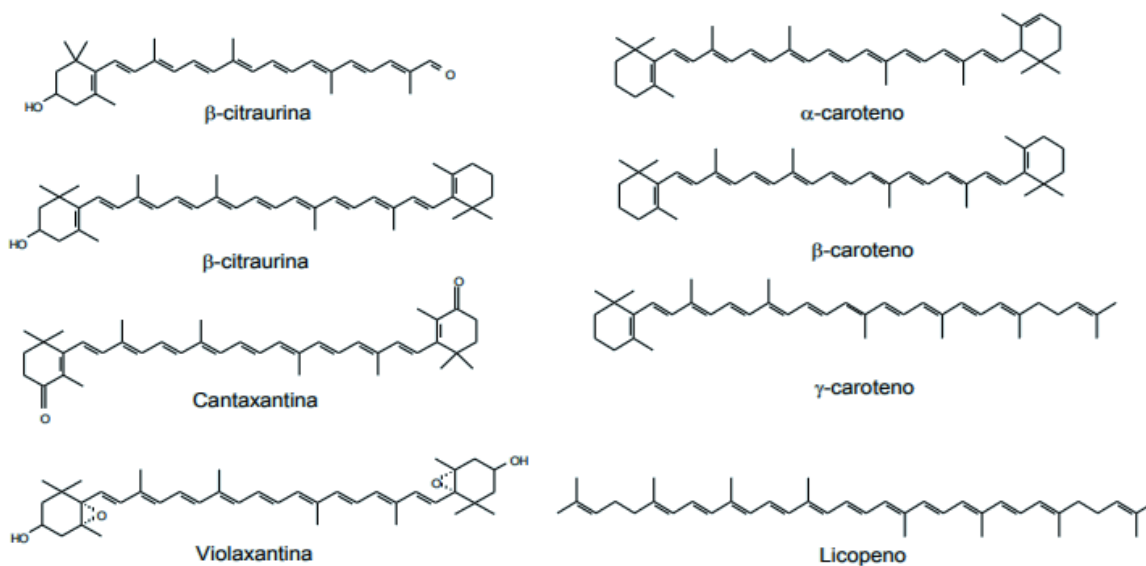
Dentro da fisiologia vegetal, os flavonoides podem desempenhar diversas funções no desenvolvimento da planta, como participar do metabolismo de fotossíntese, auxiliando em seu crescimento e no processo de formação de sementes, atuar em sistemas de proteção biológica como a proteção contra danos causados pela exposição a luz UV, proteção contra patógenos, processos de aclimação à temperaturas e resistência à períodos de seca, além de serem moléculas sinalizadoras para interações alelopáticas, como fitoalexinas e agentes desintoxicantes (PAGLIUSO et al., 2020).

Quanto as suas atividades farmacológicas, os flavonoides possuem diversas atividades biológicas constatadas, como ação antiviral, antifúngica, antibacteriana, anti-inflamatória, anti-hepatotóxica, anti-osteoporótica, antiulcera, imunoreguladora e antiproliferativa, além de interagirem com enzimas como ciclooxygenase e lipooxygenase, inibindo sua função, resultando na diminuição da agregação plaquetária, auxiliando na proteção de doenças cardiovasculares (PLAZONI^c et al., 2009). Algumas atividades farmacológicas deste grupo de moléculas podem ser associadas também à sua capacidade de alteração da permeabilidade da membrana plasmática pela modificação da composição dos ácidos graxos e fosfolipídios, presentes na bicamada lipídica, ou então pela interação com as proteínas de membrana, modificando os tipos de interações que esta membrana celular pode exercer, deixando-a mais permeável (PASHAEI, 2016).

2.4.2 Carotenoides

Os carotenoides são um grupo de moléculas, com mais de 600 estruturas conhecidas, comumente encontradas em folhas, frutos e flores, e produzidas apenas por bactérias, fungos, algas e plantas, e podem ser acumulados no organismo de animais por meio da alimentação, como em crustáceos (camarão, lagosta e siri), em aves (flamingo) e em peixes (truta e salmão) (UENOJO et al., 2007; MESQUITA et al., 2017). São classificadas como pigmentos, pois são responsáveis por proporcionar diferentes tonalidades de vermelho, laranja e amarelo para estes organismos. Grande parte dos carotenoides são derivados de uma molécula com estrutura de 40 carbonos, podendo apresentar grupos terminais cíclicos em sua cadeia central, com possível substituição por grupos funcionais de oxigênio. São divididos em carotenos, que apresentam apenas átomos de carbono e hidrogênio, e carotenoides oxidados, com pelo menos um átomo de oxigênio em sua cadeia, chamados xantofilas (Figura 4) (STAHL e SIES, 2003).

Figura 4 - Exemplos de xantofilas à esquerda e de carotenos à direita



Fonte: MESQUITA et al., 2017

Estes são tetraterpenóides que se modificam por reações de ciclização, hidrogenação e desidrogenação, modificações de duplas ligações, encurtamentos e alongamentos, isomeração e introdução de grupos de oxigênio funcionais, sendo que estas modificações estruturais, são fatores determinantes para identificação de suas propriedades biológicas (UENOJO et al., 2007). São formados por unidades de isopentenil pirofato (IPP) e seu isômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP), podendo ser produzidos pela via do ácido mevalônico, fazendo uso do Acetil-CoA para produzir IPP, ou do metileritritol fosfato, onde a produção de IPP e DMAPP é feita a partir de piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (G3P), dependendo do organismo que está sendo produzido (MESQUITA et al., 2017).

Estas moléculas são encontradas em organelas celulares, como cloroplastos e cromoplastos, onde no primeiro, normalmente associados a proteínas, atuando como pigmentos fotoprotetores na fotossíntese e estabilizadores de membrana, enquanto que no segundo, são depositados em forma de cristal ou como gotículas de óleo (SILVA et al., 2010). Alguns carotenóides apresentam a característica de serem precursores de vitamina A, como as moléculas de α e β -caroteno e α e β -criptoxantina, que possuem pelo menos 11 carbonos, um anel β não substituído e duplas ligações conjugadas, para terem a capacidade de serem convertidos a retinol quando ingeridos (MESQUITA et al., 2017).

Devido a sua estrutura contendo grupos terminais cíclicos, alguns carotenóides podem apresentar atividade antioxidante, pois gera um ambiente rico em elétrons do

polieno, fazendo dos carotenoides moléculas de fácil oxidação (SILVA et al., 2010). A captura dos radicais livres pode ser feita por meio de mecanismos físicos ou químicos, sendo o primeiro uma transferência de energia, onde a molécula de EROs passa sua energia de excitação para a molécula de carotenoide, que dissipa essa energia por meio de interações rotacionais e vibracionais, enquanto que os mecanismos químicos podem ser por transferência de elétron, oxidando a molécula de carotenoide e formando um radical catiônico, por abstração de hidrogênio, retirando um átomo de hidrogênio e gerando um radical neutro, ou pela adição de um radical ao carotenoide para formar um radical aduto, sendo a astaxantina o carotenoide com maior atividade antioxidante (MESQUITA et al., 2017).

2.4.3 Polissacarídeos

Os polissacarídeos são moléculas caracterizadas por polímeros de carboidratos, podendo ser de um único tipo ou de tipos diferentes de monossacarídeos, sendo que estes polímeros naturais apresentam característica de serem inertes, não-tóxicos, biocompatíveis e biodegradáveis, conferindo a eles uma alta aplicabilidade em diferentes áreas da indústria, especialmente na alimentícia e farmacêutica (VASCONCELOS et al., 2015). Dentre os polissacarídeos, existem os polissacarídeos sulfatados (PS) que são moléculas complexas, com estrutura rica em poliânions, formados de açúcares carregados negativamente, por apresentarem um grupo sulfato que possibilitam sua ligação com diversas proteínas (RAMOS, 2022).

Os PS são encontrados em microrganismos, em animais e em diferentes gêneros de algas marinhas, onde, neste último, são localizados na matriz mucilaginosa do organismo e estão relacionados a sua proteção contra a desidratação e radiação solar em períodos de maré baixa, além de sua função estrutural, conferindo flexibilidade, quando submersa, e rigidez a alga, quando exposta ao sol, mantendo-a esticada o suficiente para captar a luz e nutrientes do ambiente. Dentro das algas vermelhas, os PS mais encontrados são as galactanas (Figura 5), moléculas lineares compostas por β -D-galactopiranosose e 3,6-anidrogallactopiranosose ou α -galactopiranosose, com diferentes posições das sulfatações, podendo ser divididas, de acordo com sua estereoquímica, em agaranas e carragenanas (COSTA, 2008).

Figura 5 – Estrutura química de galactanas sulfatadas



Fonte: (SOARES, 2016)

Diversos estudos já demonstraram as atividades biológicas destas moléculas, sendo a ação antiviral a mais estudada (COSTA, 2008), além da sua atividade antitrombótica, antitumoral, antiproliferativa, anticoagulante, anti-inflamatória e antioxidante (RAMOS, 2022), sendo esta última relacionada principalmente a sua ação inibitória na formação de radicais superóxidos e inibição da peroxidação lipídica, além da captura dos radicais peróxido de hidrogênio e capacidade de redução do íon ferro, atividade ligada especialmente as moléculas de fucanas (COSTA, 2008).

2.5 Microencapsulação

Os estudos de extratos e compostos ativos naturais, apesar de ser altamente difundido, encontra-se limitações que podem interferir de maneira direta e indireta nos constituintes e na atividade biológica. Tais limitações constitui-se principalmente nas condições de preparo e formulações empregadas para produção dos extratos e compostos ativos, o que pode levar à alteração físico-química (pH, fotolabilidade, temperatura, entre outros) e assim alterar a atividade biológica esperada (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000). Contudo, os avanços nas pesquisas de imobilização e liberação de compostos ativos refletem uma tendência tecnológica mundial em todos os setores de produção, capaz de oferecer uma infinidade de benefícios e facilidades em todas as áreas de atuação, principalmente em sistemas mais eficientes para veicular e aumentar a eficácia de compostos ativos no organismo.

Entre as alternativas que podem ser utilizadas para preservar as características do material vegetal, destacam-se a encapsulação em diferentes estruturas como microcápsulas, lipossomas, microemulsões e nanopartículas poliméricas (MORA-HUERTAS et al., 2010). Entre estas estruturas possíveis, de potencialização e liberação de compostos ativos, destaca-se a microencapsulação, pois este processo resulta em maior proteção, melhora a especificidade do produto final, e otimiza a ação dos mesmos em sítios

alvo, devido ao fato, por exemplo, de alguns princípios ativos apresentarem comportamento instável na presença de outros compostos medicinais, alimentícios ou cosméticos (FUJIWARA, 2012; SIMEONI et al., 2014). A microencapsulação pode prolongar a estabilidade do composto e, conseqüentemente, o *shelflife* do produto, permitindo que seu valor medicinal e/ou nutricional não seja significativamente diminuído entre as datas de produção e de consumo (AZEREDO, 2005; KUANG et al., 2010).

Somado a isso, sabe-se que a indústria farmacêutica, o setor alimentício e cosmético, tem incentivado o desenvolvimento de novas formas de conservação de compostos ativos, e de sistemas de liberação controlada em sítio específico de ação, e dentre estas técnicas, está a microencapsulação. Esta técnica pode ajudar a resolver alguns dos problemas funcionais associados a estabilidade, oferecendo melhor solubilidade e produtos estáveis à oxidação, sendo possíveis de serem inseridas nas indústrias.

Na indústria farmacêutica, a microencapsulação proporciona desenvolvimento de sistemas de liberação controlada, cuja substância ativa protegida é liberada gradativamente por meio de estímulos, tais como mudança de pH, rompimento físico, intumescimento, dissolução entre outros (FREIBERG; ZHU, 2004;). Esta liberação controlada é um processo que está relacionado às formas farmacêuticas com liberação modificada, a qual pode ser retardada ou prolongada (SUAVE et al., 2006; PEREIRA et al., 2018). O controle da liberação do material encapsulado está diretamente relacionado ao material encapsulante, estrutura química, espessura, porosidade, solubilidade, tamanho e a distribuição dos poros nas micropartículas (ARAUJO-DÍAZ et al., 2017).

Na indústria alimentícia, a microencapsulação pode trazer uma nova maneira de produção de alimentos não apenas como fonte de nutrientes, mas também como fonte de conservação da saúde, onde podem ser inseridos cálcio, para prevenir a osteoporose, ou compostos fenólicos, para prevenir o desenvolvimento de problemas cardíacos, entre outros compostos que podem trazer maior bem-estar para a população (SILVA et al., 2014). Esta técnica permite a proteção de compostos voláteis responsáveis pelo aroma e sabor, corantes, acidulantes enzimáticos, vitaminas, microrganismos probióticos e agentes antifúngicos (SANTOS; FERREIRA; GROSSO, 2000; ARAUJO-DÍAZ et al., 2017). Já no setor agroquímico, o processo permite a liberação controlada dos defensivos agrícolas, importante para evitar a utilização excessiva dos mesmos (SUAVE et al., 2006).

As microcápsulas são partículas de 0,2 a 5.000 µm de diâmetro, com um núcleo interno, central, onde fica contida a substância ativa, que é envolta por uma camada polimérica, constituída pelo material de parede utilizado, sendo que este material deve

apresentar características específicas, como não ter reatividade com as substâncias do núcleo, ter a capacidade de manter o núcleo dentro da microcápsula, fornecer proteção contra condições ambientais; não apresentar sabor desagradável no caso de produtos alimentares e ser economicamente viável (SILVA et al., 2014).

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo avaliar os extratos da planta aquática *Lemna aequinoctialis* e da macroalga *Pyropia spiralis* quanto ao potencial antioxidante por meio dos testes do DPPH, FRAP, sequestro do NO, peroxidação lipídica pelo teste TBARS, e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC); determinar a atividade antiglicante destes extratos por meio dos ensaios de Mobilidade Relativa em Eletroforese (MRE), determinação de grupos de aminas livres e inibição da formação de AGEs; e realizar a caracterização fitoquímica dos extratos por meio da determinação do teor total de polifenóis, flavonoides, composição mineral e proteínas totais. Além de desenvolver um método de microencapsulação dos extratos e caracterizar as microcápsulas produzidas com os extratos contendo Maltodextrina DE20 como material de parede.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material vegetal

Espécimes de *Lemna aequinoctialis* (lentilha d'água) foram coletados de tanques de aquicultura integral multitrófica (AIMT) com bagre africano (*Clarias gariepinus*) no Município de Cajati, Estado de São Paulo. Os sistemas integrados multitróficos de produção aquícola (AIMT) são compostos por uma espécie que se torna fonte de energia para outra se desenvolver, numa lógica de reutilização e aproveitamento de nutrientes, recursos naturais, humanos e econômicos (REID et al., 2020). Além dos espécimes oriundos dos tanques de aquicultura, foram coletadas lentilhas d'água (*Lemna aequinoctialis*) em condições de campo, no Estado de São Paulo. O material vegetal foi seco em estufa com circulação de ar com temperatura média de 40 °C, até peso atingir constante. O material seco foi triturado em moinho de facas para obtenção de um pó de 6 micras.

Biomassas de *Pyropia spiralis* (Nori do Brasil) foram obtidas a partir de amostras coletadas em condições de campo, na praia do Guaraú, litoral sul do Estado de São Paulo,

bem como de nori cultivada em laboratório, em parceria com o LAPLA (Laboratório de algas e plantas aquáticas do Prof. Dr. Levi Pompemayer Machado – UNESP Registro). Cada material foi seco em estufa com circulação de ar com temperatura média de 40 °C, até peso atingir constante. O material seco foi triturado em moinho de facas para obtenção de um pó de 6 micras.

4.2 Obtenção dos extratos

Os pós obtidos de cada espécie foram utilizados para obtenção dos extratos utilizando solventes de diferentes polaridades (água, hidrometanólico e metanólico). Os extratos foram preparados na proporção de 1:100 (p/v) (pó/solvente), submetidos à agitação mecânica por um período de 24 horas em temperatura ambiente, sendo então filtrados a vácuo e os resíduos vegetais foram extraídos novamente por duas vezes. Os volumes resultantes das três extrações foram reunidos e levados ao rotaevaporador sobre pressão reduzida para eliminação completa do álcool. Os extratos aquoso e resultante da evaporação do extrato hidrometanólico foram congelados e posteriormente liofilizados para obtenção dos extratos secos. Os extratos resultantes (liofilizados: aquoso e hidrometanólico e seco em dessecador: metanólico) foram avaliados quanto atividade antiglicante e antioxidante. O extrato com maior atividade foi utilizado para análises fitoquímicas e processo de microencapsulação.

4.3 Determinação da atividade antioxidante

4.3.1 Atividade sequestradora do radical DPPH

Para a avaliação da capacidade antioxidante no sequestro do radical livre DPPH foi utilizada a metodologia descrita por Blois (1958) com algumas modificações. Uma mistura reacional contendo 1 mL de tampão acetato (100 mM, pH 5,5), 1,25 mL de etanol absoluto, 250 µL de solução etanólica de DPPH (500 µM) e 50 µL de compostos fenólicos diluídos em etanol em diferentes concentrações, foi agitada em vórtex e permanecerá em repouso por um período de 30 min em ambiente de pouca luminosidade. O DPPH apresenta máxima absorvância à 517 nm, que decresce na presença de moléculas doadoras de H⁺, indicado pela mudança da coloração roxa para amarelo. As absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm. Todas as determinações foram realizadas em

triplicata para análises estatísticas e a atividade sequestradora do radical DPPH foi expressa em porcentagem sendo calculada de acordo com a equação 1, expressa a seguir.

Equação 1: Atividade antioxidante (%)= [(Acontrole–Aamostra)/Acontrole] x 100.

Onde, Acontrole é a absorbância do controle (contêm tudo exceto a amostra) e Aamostra é a absorbância da amostra após 30 min. Trolox foi utilizado como controle positivo.

4.3.2 Atividade antioxidante pelo método FRAP

Para a determinação da atividade antioxidante por meio da redução do ferro (FRAP- Ferric Reducing Antioxidant Power) foi utilizada a metodologia descrita por Kukic et al. (2008), com algumas modificações. Esta se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes (redutores) da amostra em reduzirem, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe³⁺/tripiridiltiazina (TPTZ), para formar Fe²⁺, de intensa cor azul e absorção máxima a 593nm. O reagente FRAP foi preparado no momento da análise, por meio da mistura de 25 ml de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5ml de solução TPTZ (10 mM TPTZ em 40 mM HCl) e 2,5 mL de FeCl₃ (20 mM) em solução aquosa. Uma alíquota de 100 µL da solução de composto fenólico foi adicionado a 3 mL do reagente FRAP e incubado a 37 °C em banho-maria por 30 minutos. As absorbâncias foram medidas após esse tempo e o espectrofotômetro foi zerado com a solução FRAP. A curva de calibração foi obtida com sulfato ferroso (100-2000 µM), e os resultados foram expressos em µmol Fe²⁺/mg amostra.

4.3.3 Atividade sequestradora de óxido nítrico (NO)

Para a avaliação da capacidade sequestradora de óxido nítrico (NO) foi utilizada a metodologia descrita por Marcocci et al. (1994) com algumas modificações. O NO foi gerado por decomposição espontânea de nitroprussiato de sódio (NPS) em tampão fosfato salino (PBS) e quantificado pela reação colorimétrica de Griess, onde ocorre a formação de um cromóforo róseo durante a diazotação do nitrito com a sulfanilamida e subsequente complexação com o naftiletilenodiamino (GREEN et al., 1982). Uma mistura reacional contendo 320 µL de solução de composto fenólico diluído em diferentes concentrações, 360 µL NPS (25 mM/PBS, pH 7,4) e 215 µL de reagente de Griess foi adicionada em tubos de ensaio e incubada em banho-maria 37 °C por 2 horas, na ausência de luz. A absorbância do teste foi determinada em espectrofotômetro a 540 nm. Os resultados obtidos foram

extrapolados para uma curva de calibração de nitrito de sódio, obtida sob as mesmas condições do teste e os resultados expressos em quantidade de nitrito formado ($\mu\text{M/mL}$).

4.3.4 Inibição da peroxidação lipídica (TBARS)

Para a avaliação da capacidade antioxidante pela inibição da peroxidação lipídica foi utilizada a metodologia de TBARS (tiobarbituric acid reactive species), descrita por Guimarães et al. (2010) com algumas modificações. A gema de ovo foi homogeneizada (1%, p/v) em tampão PBS (20 mM, pH 7,4). Deste homogenato, 1 mL foi sonificado e homogeneizado com 0,1 mL dos compostos fenólicos diluídos em diferentes concentrações ou controle positivo (Trolox 140 $\mu\text{g/mL}$). A peroxidação lipídica foi induzida pela adição de 0,1 mL de solução de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH; 0,12 M), durante 30 min em banho-maria a 37 °C. Após o resfriamento em temperatura ambiente, foi adicionada a reação 0,5 mL de ácido tricloroacético (15%) e 0,5 mL de ácido tiobarbitúrico (0,67%) e aquecido em banho-maria a 97 °C por 15 min. Após este período as amostras foram centrifugadas a 1200 rpm durante 10 minutos e em seguida incubadas em banho-de-gelo por mais 15 min. A absorbância do sobrenadante foi determinada em espectrofotômetro a 532 nm e os resultados foram expressos em porcentagem de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) formadas, a partir da equação 2, sendo o controle induzido apenas o AAPH sozinho.

Equação 2: $\text{TBARS (\%)} = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100$.

Onde, A_{controle} é a absorbância do controle (contêm tudo exceto a amostra) e A_{amostra} é a absorbância da amostra. O resultado foi subtraído de 100 para obtenção do valor de inibição da peroxidação lipídica.

4.3.5 Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC-FL)

O método de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), no qual radicais peroxil foram gerados pela decomposição de AAPH a 37 °C. A fluoresceína foi usada como sonda fluorescente, onde a perda de fluorescência indica dano à fluoresceína por reação com radicais peroxil. 130 μL de fluoresceína 100 nM, 20 μL de amostras e 50 μL de AAPH foram adicionados às microplacas para análise de fluorescência. As medidas

foram realizadas utilizando um fluorômetro adaptado para microplacas (Synergy H1 Hybrid Reader, Biotek, Winooski, VT, EUA) em $\lambda_{ex} = 470$ nm e $\lambda_{em} = 520$ nm, 37 °C, em intervalos de 5 min por 2 h. A sensibilidade do equipamento foi ajustada para 100. Os valores ORAC foram baseados na diferença entre uma área sob a curva de decaimento de fluorescência das amostras e o branco (AUClíquido), e equações de regressão linear entre AUClíquido e concentrações foram calculadas para todas as amostras. Os resultados foram expressos como μmol de equivalente de Trolox por mg de peso seco ($\mu\text{mol TE mg}^{-1}$ DW).

4.4 Determinação da atividade antiglicante

4.4.1 Determinação de grupos de aminos livres

Grupos amino livres das amostras glicadas foram determinados pelo método de orto-ftaldialdeído (OPA) (Ledesma-Osuna; Ramos-Clamont; Vázquez-Moreno, 2008). O reagente OPA foi preparado com 25 mL de borato de sódio 0,1 M, 2,5 mL de SDS a 20%, 100 μL de 2-mercaptoetanol e 40 mg de OPA (dissolvido em 1 mL de metanol) e ajustado a um volume de 50 mL com água destilada. Uma alíquota de amostras contendo 50 μg de proteína foi misturada para 1 mL com reagente OPA, incubadas durante 2 min à temperatura ambiente, em seguida a absorção foi lida a 340 nm contra um branco contendo o reagente OPA. BSA tratado com glicose foi considerado tendo máxima redução de grupos amina disponíveis. Para a determinação da atividade foi utilizada a equação 3, expressa em porcentagem de redução de glicação.

$$\text{Equação 3: RG\%} = (\text{Absamostra} - \text{Abscontrole}) / \text{AbsBSA} \times 100$$

Onde Absamostra é o tratamento que inclui BSA com glicose e o agente antiglicante (Aminoguanidina ou composto fenólico), Abscontrole é o tratamento com BSA mais a glicose apenas, e AbsBSA é a absorbância do BSA sozinho.

4.4.2 Inibição da Formação de AGEs

A glicação de proteínas por glicose foi avaliada utilizando o método de Vinson e Howard (1996). Em 2,5 mL do volume total da reação de glicação foi incluído diferentes diluições dos extratos (0,5 mL), 20 mg/mL de BSA, 500 mM de glicose, 0,02% (p/v) de azida

de sódio e tampão fosfato (100 mM, pH 7,4). Após incubação a 37 °C durante três semanas, as quantidades globais de AGEs fluorescentes formadas foram determinadas utilizando um espectrômetro de fluorescência, com um comprimento de onda de excitação de 330 nm e comprimento de onda de emissão de 410 nm. A porcentagem de inibição de formação de AGEs por cada composto fenólico avaliado foi calculada utilizando a equação 4, expressa a seguir.

Equação 4: % de inibição = $[1 - (\text{Flamostra} - \text{Flbranco}) / (\text{Flcontrole} - \text{Flcontrole branco})] \times 100$

Onde Flamostra–Flbranco é a diferença entre a intensidade de fluorescência de uma amostra incubada com glicose e uma incubada sem a adição de glicose, e Flcontrole–Flcontrole branco é a diferença entre a intensidade de fluorescência do controle de água destilada com a glicose e o controle sem glicose.

4.4.3 Mobilidade relativa em eletroforese (MRE)

Para a avaliação da atividade antiglicante pela mobilidade relativa em eletroforese (MRE), foram utilizadas as metodologias descritas por Miura et al. (1994) e Wijetunge e Perera (2014) com modificações. Em tubos de ensaio com tampa, uma mistura reacional contendo BSA (2 mg/mL) foi incubada em estufa a 37 °C em tampão de fosfato (10 mM, pH 7,4) com MGO (40 mM); ribose (1 M); Cu²⁺ (10 mM); MGO (40 mM) mais Cu²⁺ (10 mM); ribose (1 M) mais Cu²⁺ (10 mM), na presença ou na ausência dos compostos fenólicos (2 mg/mL), durante cinco dias. Após incubação, alíquotas de 15 µL das reações (BSA glicada), foram analisadas utilizando eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (PAGE), corrente constante de 20 mA por aproximadamente 3 horas. As amostras foram carregadas sem desnaturação e após a separação, as bandas de proteína foram visualizadas por coloração do gel com Coomassie-Blue (R-250). As alterações na posição e migração das bandas de BSA foram comparadas.

4.5 Microencapsulação

4.5.1 Microencapsulação dos extratos em Maltodextrina

A metodologia utilizada na microencapsulação dos extratos foi realizada de acordo com a proposta por Pereira (2018) com adaptações laboratoriais. Foram preparadas soluções contendo 0,5, 1,0 e 2,0 gramas de extrato, dissolvido em 5 mL de etanol, formando soluções de 10%, 20% e 40%. Em seguida, foram pesadas as quantidades de 5, 10 e 20 gramas de maltodextrina DE20, dissolvida em 80 mL de água destilada a 60°C. Após a dissolução completa da maltodextrina, a solução foi resfriada a temperatura ambiente, sendo adicionada a solução contendo os extratos. A solução foi agitada separadamente em agitador mecânico por um período de 30 minutos a 2500 rpm. Após o período de agitação, a solução contendo as microcápsulas foi concentrada em rotaevaporador. Cada uma das soluções, obtidas com as respectivas proporções, de ambos os extratos, foi previamente congelada e submetida a processo de secagem em liofilizador. Após o período de secagem, foi obtido um pó seco e fino, por meio de moagem do liofilizado. Os pós de maltodextrina com as microcápsulas foram avaliados por meio dos testes antioxidante do DPPH e FRAP, e foram determinados os polifenóis e flavonoides totais.

4.5.2 Avaliação das microcápsulas

4.5.2.1 Eficiência da encapsulação de acordo com compostos fenólicos (%)

Foi considerada como eficiência de encapsulação a relação existente entre a quantidade de compostos fenólicos não encapsulados, presentes na superfície das micropartículas, e o total de compostos fenólicos que foi microencapsulado. O experimento para determinar a eficiência da encapsulação foi dividido em duas partes, sendo a primeira de extração dos compostos fenólicos que não foram microencapsulados, e a segunda, após a ruptura e liberação das micropartículas, para quantificação dos compostos fenólicos que nelas estavam contidos. A eficiência de encapsulação foi calculada utilizando-se a equação 5, expressa a seguir.

Equação 5: Eficiência de encapsulação (%) = $(ST - FS) / FT \times 100$

Onde ST (polifenóis totais após a ruptura) é a quantidade de compostos polifenólicos de uma quantidade conhecida de microcápsulas, FS (compostos polifenólicos da superfície) é a quantidade de compostos fenólicos contida na mesma quantidade de microcápsulas, sem a liberação de seus compostos, e FT é a quantidade de compostos fenólicos contidos na mesma concentração do extrato bruto da espécie (antes do processo de encapsulação).

4.5.2.2 Ruptura das micropartículas para liberação dos compostos

Para a liberação dos ativos das microcápsulas produzidas com maltodextrina D20 (ME20), sua estrutura de revestimento foi completamente rompida de acordo com método proposto por Robert et al. (2010), com adaptações. As microcápsulas foram pesadas de acordo com o teor de sólidos totais (ST), onde $ST = [(MD20 + Extrato) - MD20 \text{ inicial}]$. As microcápsulas foram dispersas em 1 mL de solução de etanol, ácido acético e água (50:8:42 v/v/v). Esta dispersão foi agitada utilizando-se o agitador Vórtex por 1 minuto e, em seguida, sonicada com frequência de 50 Hz, duas vezes por 20 min (com intervalo de 5 minutos). O sobrenadante foi centrifugado a 10.000 G durante 5 min e, em seguida, filtrado em filtro Millipore (0,45 µm). A solução resultante da liberação das microcápsulas foi avaliada por meio dos testes antioxidante do DPPH e FRAP, de acordo com a descrição realizada nos subitens 4.3.1 e 4.3.2, respectivamente, e foram determinados os polifenóis totais, conforme subitem 4.5.3.1.

4.5.2.3 Caracterização físico-química e estabilidade

4.5.2.3.1 Análise Macroscópica

As suspensões foram analisadas sob o aspecto visual, em relação à homogeneidade, ausência de separação de fases (coalescência, formação de precipitados).

4.5.2.3.2 Determinação do diâmetro médio das partículas, índice de polidispersão (IPD) e Potencial Zeta

As análises foram realizadas utilizando a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), com auxílio de um Zetasizer (Pro ZS, Malvern Instruments). Este equipamento

possui um ângulo de espalhamento fixo em 173° e um laser com o comprimento de onda em 633 nm. As análises de potencial zeta também foram realizadas no Zetasizer (Pro ZS, Malvern Instruments). Por meio das análises de potencial zeta é possível avaliar a estabilidade das nanopartículas liofilizadas e diluídas. As amostras foram preparadas no tampão de síntese e em seguida foram filtradas em filtros com poros de $0,22\ \mu\text{m}$, na temperatura de 25°C . Todas as amostras foram analisadas em triplicata e cada resultado de Dh ou de valor de potencial zeta é uma média de 20 análises.

4.5.3 Análises fitoquímicas dos extratos e compostos liberados pelas microcápsulas

4.5.3.1 Determinação de polifenóis totais

O método utilizado para a determinação dos compostos de polifenóis totais foi o de Folin-Ciocalteu, o ácido gálico foi utilizado como padrão para as dosagens, e os resultados foram expressos em ácido gálico equivalentes (AGE). A cada 0,5 mL de amostra (extrato) foram adicionados 5 mL de água destilada e 0,25 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (molibdato, tungstato e ácido fosfórico). Após 3 min foi adicionado 1 mL de solução de Na_2CO_3 saturada a 10 % e a mistura armazenada por 1 h. A absorbância foi medida a 725 nm utilizando um espectrofotômetro UV-Vis. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.5.3.2 Determinação de flavonoides totais

A dosagem dos flavonoides totais dos extratos foi realizada por meio de espectrofotometria UV-Vis, de acordo com a metodologia proposta por Zhishen et al., (1999), que é baseada na complexação dos flavonoides com AlCl_3 , ocorrendo o deslocamento das bandas de absorção para maiores comprimentos de onda. Uma alíquota de 250 μL dos extratos foram misturados com 1,25 mL de água destilada e 75 μL de uma solução de NaNO_2 a 5 %. Após 6 min, 150 μL de uma solução de $\text{AlCl}_3/\text{H}_2\text{O}$ a 10 % foi adicionada a solução reagente. Decorridos 5 minutos, 0,5 mL uma solução de NaOH 1M foi adicionada e então o volume total foi completado com 2,5 mL de água destilada. As amostras foram agitadas em vórtex por 1 min e as absorbâncias foram mensuradas a 510 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em equivalência ao flavonoide rutina (RE).

4.5.3.3 Determinação do teor de proteínas totais

A extração das proteínas solúveis totais foi realizada por meio da maceração dos extratos da planta aquática e alga em tampão de extração (0,2 M tampão fosfato, pH 8,0, 5 mM EDTA; 1mM DTT) na proporção de 1mg de pó por 10 mL de tampão. A solução será centrifugada (12000 rpm a 4°C) por 15 minutos. A concentração das proteínas solúveis totais será determinada por espectrofotometria UV-vis (Shimadzu – UV 1800) a 595 nm, após a adição de solução de Coomassie Blue, de acordo do método de Bradford (1976). A concentração de proteínas será determinada com a utilização de curva-padrão externa, utilizando-se Soro Albumina Bovina (BSA) como padrão e os resultados foram expressos em mg/g de extrato. Nesta análise, foram realizadas três repetições para cada amostra.

4.5.3.4 Determinação de composição mineral

As amostras de biomassa seca trituradas serão enviadas para o Laboratório de Fertilidade do Solo e Nutrição de Plantas – LAFEN, localizado na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Câmpus Experimental de Registro, sendo determinados os teores de micronutrientes (B; Cu; Fe; Mn e Zn) e macronutrientes (N; P; K; Ca; Mg e S). O N pelo método Kjeldahl (1883), o P por colorimetria, o S por turbidimetria do sulfato de bário, o B por Azometina-H e o K, Ca, Mg, Cu, Fe, Mn e Zn em espectrofotômetro de absorção atômica, após digestão nítrico-perclórica de acordo com o proposto por Malavolta; Vitti; Oliveira (1997). Os resultados serão expressos em teores mg/g de biomassa seca. Nesta análise, serão realizadas três repetições (n=3) para cada amostra.

4.6 Análise Estatística

Os dados obtidos foram avaliados pelo software BioEstat, versão 5.0, por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey como post hoc teste. Em todos os casos, as diferenças puderam ser consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados obtidos com extrato bruto das espécies

5.1.1 *Lemna aequinoctialis*

Foram realizados testes tanto para atividade antioxidante, quanto antiglicante, que antecederam o processo de encapsulação, para avaliação dos resultados obtidos com os diferentes extratos brutos das duas espécies estudadas, e comparação com os resultados obtidos após a encapsulação dos extratos que apresentaram melhores resultados nos extratos. Para o testes de atividade antioxidante pelo ensaio de sequestro do radical livre DPPH, por meio de sua redução pelos compostos antioxidantes presentes no material vegetal, que tem capacidade de doar um átomo de hidrogênio (um elétron) para o radical, deixando este mais estável, resultando também na formação de hidrazina que proporciona a mudança de cor da solução, de roxo escuro para amarelo (Pires et al, 2017) os extratos apresentaram para a espécie *Lemna aequinoctialis* resultado de 50,9% e 54,81% de atividade na concentração de 2 mg/mL dos extratos metanólico (Tabela 1) e hidrometanólico (Tabela 2) respectivamente, e 47,75% de sequestro deste radical na concentração de 5 mg/mL para o extrato aquoso (Tabela 3). Andriani, et al (2022) observaram um resultado semelhante para *L. perpusilla*, onde obteve IC50 de 54,51 ppm, mostrando o potencial de atividade antioxidante desse gênero.

O teste antioxidante que avalia o potencial dos redutores (antioxidantes) em quelar o íon ferro, pelo teste FRAP, onde estes compostos reduzem o complexo $\text{Fe}^{+3}/\text{TPTZ}$ em Fe^{+2} , formando íons menos reativos e que são usados pelo nosso organismo para o transporte de oxigênio nas hemácias, por exemplo, também foi realizado. Quando ocorre a reação de redução a solução sofre uma alteração em sua coloração, que vai de um roxo claro para um roxo intenso (URREA-VICTORIA et al, 2016). Para este teste a *L. aequinoctialis* obteve resultado de 610,41 μM e 698,92 μM equivalentes ao trolox por grama dos extratos metanólico (Tabela 1) e hidrometanólico (Tabela 2), respectivamente, na concentração de 2 mg/mL, e 611,23 $\mu\text{M}/\text{ETg}$ para concentração de 5 mg/mL do extrato aquoso (Tabela 3), demonstrando que os três extratos possuem poder de quelar o íon ferro, assim como observado por Gülçin, et al (2010) que obtiveram 63% e 61% de atividade redutora deste íon pelos extratos aquoso e etanólico de *Lemna minor*, respectivamente. O estudo sobre o efeito da exposição de *L. minor* a baixas concentrações de cobre feito por Razinger, et al (2007) também demonstram presença de sistemas antioxidantes que envolvem enzimas como catalases, glutathione redutases e guaiacol peroxidases, que reforçam os resultados de atividade obtidos no presente estudo.

Tabela 1 – Atividade antioxidante (DPPH e FRAP) do extrato metanólico de *L. aequinoctialis*

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante	
		DPPH ¹	FRAP ²
Metanólico	0,10	5,06±1,97	108,92±4,80
	0,25	11,80±0,85	158,92±6,71
	0,50	24,80±0,32	253,53±13,80
	0,75	27,50±2,24	328,92±9,79
	1	39,90±3,38	382,76±7,70
	2	50,90±1,10	610,41±24,86
	5	17,90±3,01	1.401,23±13,60
	10	-	1.897,38±14,20

Valores apresentados como média±desvio padrão. ¹ = % Atividade Antioxidante e ² = µMTrolox Equivalente/g de extrato.

Tabela 2 – Atividade antioxidante (DPPH e FRAP) do extrato hidrometanólico de *L. aequinoctialis*

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante	
		DPPH ¹	FRAP ²
Hidrometanólico	0,10	-	115,84±6,98
	0,25	1,90±1,31	165,84±6,40
	0,50	9,90±2,48	239,69±2,77
	0,75	24,30±5,77	335,07±3,79
	1	45,76±13,57	346,61±9,89
	2	54,81±2,03	698,92±46,28
	5	38,98±2,98	1.212,76±23,58
	10	6,22±0,86	1.725,84±14,02

Valores apresentados como média±desvio padrão. ¹ = % Atividade Antioxidante e ² = µMTrolox Equivalente/g de extrato.

Tabela 3 – Atividade antioxidante (DPPH e FRAP) do extrato aquoso de *L. aequinoctialis*

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante	
		DPPH ¹	FRAP ²
Aquoso	0,10	2,40±0,41	110,46±2,22
	0,25	5,80±0,57	137,38±3,79
	0,50	9,30±4,26	200,46±12,66
	0,75	16,20±1,76	252±11,92
	1	24,30±2,64	190,46±3,35
	2	23,87±13,38	459,69±58,13
	5	47,75±6,82	611,23±41,06
	10	41,30±0,98	1.295,84±86,32

Valores apresentados como média±desvio padrão. ¹ = % Atividade Antioxidante e ² = µMTrolox Equivalente/g de extrato.

Para o teste do oxido nítrico foi observado uma menor formação de nitrito, resultante da reação entre as substâncias redutoras do extrato com os radicais oxidantes do reagente nitroprussiato de sódio, na concentração de 1 mg/mL nos três extratos de *Lemna aequinoctialis*, que apresentou 45,96 µM de nitrito formado por mililitro para o extrato hidrometanólico (Tabela 4), 16,49 µM para o extrato aquoso (Tabela 5) e 60,14 µM para o

metanólico (Tabela 6). Khurana, Khurana e Babbar (2011) demonstraram os efeitos do óxido nítrico e do cianeto na floração desta mesma espécie, confirmando o potencial dos seus metabólitos em capturar e acumular esse radical em seu metabolismo. Já na avaliação da inibição da peroxidação lipídica, pelo teste de TBARS, mostrou que na concentração de 1 mg/mL, os extratos metanólico (Tabela 6) e aquoso (Tabela 5), apresentaram 67,58% e 49,54% de formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico respectivamente, o que é equivalente a 32,42% e 50,46% de inibição da peroxidação, e o extrato hidrometanólico (Tabela 4) obteve 46,01% de formação de TBARS, equivalente a 53,99% de inibição na concentração de 10 mg/mL.

Tabela 4 – Atividade antioxidante (NO e TBARS) do extrato hidrometanólico de *L. aequinoctialis*

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante	
		NO ¹	TBARS ²
Hidrometanólico	1	45,96±0,20	45,37±4,20
	2	47,27±0,86	45,05±0,64
	5	73,55±7,27	46,33±2,35
	10	94,02±0,78	53,99±0,73

Valores apresentados como média±desvio padrão. ¹ = µM de nitrito formado / mL de extrato e ² = % de inibição da peroxidação lipídica.

Tabela 5 – Atividade antioxidante (NO e TBARS) do extrato aquoso de *L. aequinoctialis*

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante	
		NO ¹	TBARS ²
Aquoso	1	16,49±0,16	50,46±6,17
	2	23,86±5,23	48,18±4,09
	5	42,23±4,97	42,27±3,19
	10	74,94±8,29	44,10±0,91

Valores apresentados como média±desvio padrão. ¹ = µM de nitrito formado / mL de extrato e ² = % de inibição da peroxidação lipídica.

Tabela 6 – Atividade antioxidante (NO e TBARS) do extrato metanólico de *L. aequinoctialis*

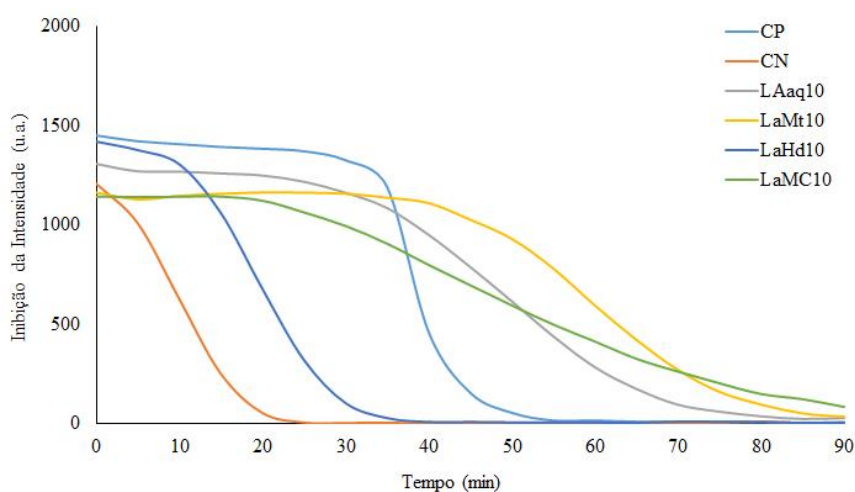
Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante	
		NO ¹	TBARS ²
Metanólico	1	60,14±4,04	32,42±3,74
	2	69,91±2,17	27,98±1,29
	5	76,34±0,99	29,69±2,71
	10	78,51±0,04	32,42±3,35

Valores apresentados como média±desvio padrão. ¹ = µM de nitrito formado / mL de extrato e ² = % de inibição da peroxidação lipídica.

Para finalizar a avaliação do potencial de atividade antioxidante foi realizado o teste de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) que identifica a eficiência do extrato em capturar estes radicais. Este teste é feito pela captura da absorbância de

fluorescência, onde a interação dos radicais de oxigênio com a fluoresceína causa uma perda da capacidade desta molécula em emitir fluorescência, ou seja, se os radicais forem capturados pelo extrato, a amostra irá emitir fluorescência pois a molécula de fluoresceína estará ativa. Sendo assim, como pode ser observado no gráfico expresso na Figura 6, os três extratos demonstraram ter atividade de captura dos radicais, sendo o extrato metanólico o que permaneceu com eficiência da ação por mais tempo durante a aplicação do teste, seguido do extrato aquoso e hidrometanólico com um menor tempo de atividade, porém, com uma intensidade de ação inicial semelhante ao controle positivo, e maior que os outros dois extratos. Com isso, estes resultados obtidos com os três extratos confirmam o grande potencial desta espécie em controlar o desequilíbrio entre a produção e captura dos radicais livres, podendo diminuir significativamente os danos causados pelo estresse oxidativo.

Figura 6 - Medição por alterações na intensidade da fluoresceína de 0 a 90 minutos. Efeito dos diferentes extratos de *Lemna aequinoctialis* (Lentilha d'água) (LAaq10 = extrato aquoso a 10 mg/mL, LaMt10 = extrato metanólico a 10 mg/mL, LaHd10 = extrato hidrometanólico a 10 mg/mL, e LaMC10 = compostos das microcápsulas a 10mg/mL. Trolox é o controle positivo na curva de decaimento.



Além dos resultados de atividade antioxidante, também foram realizados ensaios de determinação da composição fitoquímica destes extratos por meio da quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides totais. O teste que determina a quantidade de polifenóis foi baseado na interação do reagente *Folin-Ciocalteu* com as substâncias redutoras dos extratos. Um meio alcalino proporciona a dissociação de um próton destes compostos fenólicos, levando a formação do ânion fenolato, que possui a capacidade de reduzir os ácidos fosfotúngstico e fosfomolibdico presentes no reagente, em óxido de tungstênio e óxido de molibdênio, que faz a solução mudar da cor amarela para a cor azul (Pires et al,

2017). Após leitura no espectrofotômetro de UV-Vis, foi observado a presença de 491,33 mg/mL no extrato metanólico (Tabela 7), 328 mg/mL no aquoso (Tabela 8) e 529,11 mg/mL no extrato hidrometanólico (Tabela 9), de polifenóis totais equivalentes ao ácido gálico (EAG). E para determinar a quantidade de flavonoides nos extratos, foi utilizado um método proposto por Zhishen et al., (1999) onde acontece uma mudança nas bandas de absorção destas moléculas, pela sua complexação com o cloreto de alumínio, no espectrofotômetro de luz UV. Para este teste a *L. aequinoctialis* apresentou 922,625 mg/mL, 220,125 mg/mL e 970,12 mg/mL de flavonoides equivalentes a rutina para os extratos metanólico (Tabela 7), aquoso (Tabela 8) e hidrometanólico (Tabela 9), respectivamente.

Tabela 7 – Determinação dos teores totais de fenóis e flavonoides no extrato metanólico de *L. aequinoctialis*.

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Análises fitoquímicas	
		Fenóis totais ¹	Flavonoides ¹
Metanólico	0,10	-	-
	0,25	2,44	-
	0,50	16,88	-
	0,75	31,33	-
	1	35,78	-
	2	81,33	258,875
	5	224,67	922,625
	10	491,33	1.822,625

¹ = mg de Ácido gálico equivalente/g de extrato; ² = mg de Rutina equivalente/g de extrato

Tabela 8 – Determinação dos teores totais de fenóis e flavonoides no extrato aquoso de *L. aequinoctialis*.

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Análises fitoquímicas	
		Fenóis totais	Flavonoides
Aquoso	0,10	-	-
	0,25	1,33	-
	0,50	13,55	-
	0,75	31,33	-
	1	53,56	-
	2	68	-
	5	133,56	36,375
	10	328	220,125

¹ = mg de Ácido gálico equivalente/g de extrato; ² = mg de Rutina equivalente/g de extrato

Tabela 9 – Determinação dos teores totais de fenóis e flavonoides no extrato hidrometanólico de *L. aequinoctialis*.

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Análises fitoquímicas	
		Fenóis totais ¹	Flavonoides ²
Hidrometanólico	0,10	3,56	-
	0,25	10,22	-
	0,50	29,11	-
	0,75	45,78	-
	1	58	-
	2	115,78	2,62
	5	269,11	252,62
	10	529,11	970,12

¹ = mg de Ácido gálico equivalente/g de extrato; ² = mg de Rutina equivalente/g de extrato

Esses resultados podem ser comparados com os estudos de Andriani, et al (2022), que demonstraram a presença de compostos como alcalóides, flavonóides, carotenóides, polifenóis, taninos, esteróides e triterpenóides para a espécie *Lemna perpusilla*, apresentando um valor de 18,5 mg/L de compostos fenólicos totais. O estudo apresentado por Gülçin et al (2010) demonstrou 22 µg/mg de compostos fenólicos totais para o extrato aquoso, e 16,7 µg/mg para o extrato etanólico de *L. minor*, além de observarem 4,5 µg/mg e 17,4 µg/mg de flavonoides totais para os extratos aquoso e etanólico respectivamente. Baek, Saeed e Choi (2021) também apresentaram um estudo de revisão bibliográfica das diversas espécies da família Lemnaceae, confirmando a presença de flavonoides, fenilpropanóides, taninos e terpenóides, que podem variar entre 1,3% e 2,9% em *Lemna minor*, por exemplo.

A determinação da composição mineral e quantificação de proteínas totais do extrato de *L. aequinoctialis* está expresso na Tabela 10, onde pode ser observado que o mineral mais abundante para esta espécie é o potássio, com 22 g/kg, porém, é importante ressaltar também que esta espécie apresenta quantidade significativas de ferro e manganês, além de demonstrar presença de nitrogênio que pode estar presente em sua composição em forma de proteína, que pode ser observado uma quantidade de 293,8 g/kg de proteínas totais, se mostrando uma excelente fonte de proteínas e minerais para alimentação.

Tabela 10 – Composição mineral e proteínas totais de *Lemna aequinoctialis* e *Pyropia spiralis*

Componentes	<i>Pyropia spiralis</i> *	<i>Lemna aequinoctialis</i> *
Nitrogênio (g/Kg)	10,7±0,2	47,0±0,9
Fósforo (g/Kg)	6,4±0,1	8,5±0,2
Potássio (g/Kg)	25,0±0,5	22,0±0,4
Cálcio (g/Kg)	4,0±0,1	11,0±0,2
Magnésio (g/Kg)	2,3±0,0	3,6±0,1
Enxofre (g/Kg)	7,9±0,2	4,5±0,1
Boro (mg/Kg)	46,0±2,9	99,0±4,2
Cobre (mg/Kg)	5,0±0,1	14,0±0,3
Ferro (mg/Kg)	146,0±4,9	266,0±5,3
Manganês (mg/Kg)	21,0±0,4	234,0±4,7
Zinco (mg/Kg)	28,0±0,6	72,0±1,4
Proteínas totais (g/Kg)	66,9±1,3	293,8±5,9

* Valores representados como média ± desvio padrão

Também foram realizados testes para determinar a atividade antiglicação desta espécie, porém, tanto para atividade antiglicante, quanto para produção das microcápsulas posteriormente, os testes foram feitos apenas com o extrato que apresentou melhores resultados para os testes antioxidante anteriores, uma vez que estes exigem procedimentos mais complexos e mais demorados em comparação com a atividade antioxidante, sendo o extrato hidrometanólico o escolhido para esta fase. Com isso, foi feito o processo de glicação das amostras em estufa, para realizar a determinação dos grupos amino-livres formados, Mobilidade Relativa em Eletroforese (MRE) e inibição da formação de AGEs.

O teste que determina quantos grupos amina da proteína ficaram livres após o processo de glicação, indica o quanto o extrato conseguiu impedir a ligação com o açúcar redutor, inibindo assim os danos causados por este processo, onde o extrato bruto hidrometanólico da *L. aequinoctialis* apresentou resultado de 85,18% de inibição da glicação. Enquanto que para o teste de MRE (Figura 7), a banda 1, representando o extrato hidrometanólico, se mostrou com menos arraste do que a banda com a proteína glicada (B) e da banda de referência com a aminoguanidina (C), que é o agente de atividade antiglicante conhecida, utilizada como controle, que foi confirmada na determinação do potencial de inibição dos produtos finais de glicação avançada (AGEs), uma vez que a porcentagem de inibição do extrato bruto não se diferenciou estatisticamente da amostra contendo a aminoguanidina (Figura 8), demonstrando assim o potencial de atividade do extrato bruto desta espécie.

Figura 7 – MRE do extrato hidrometanólico de *L. aequinoctialis* (1 - BSA, 2 - BSA + Ribose, 3 - BSA + Ribose + AMG, 4 - extrato bruto, 5 - microcápsula sem liberação dos compostos, 6 - microcápsulas após liberação dos compostos).

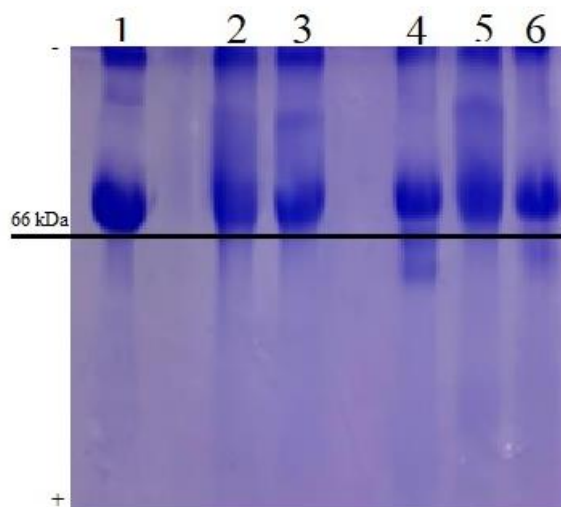
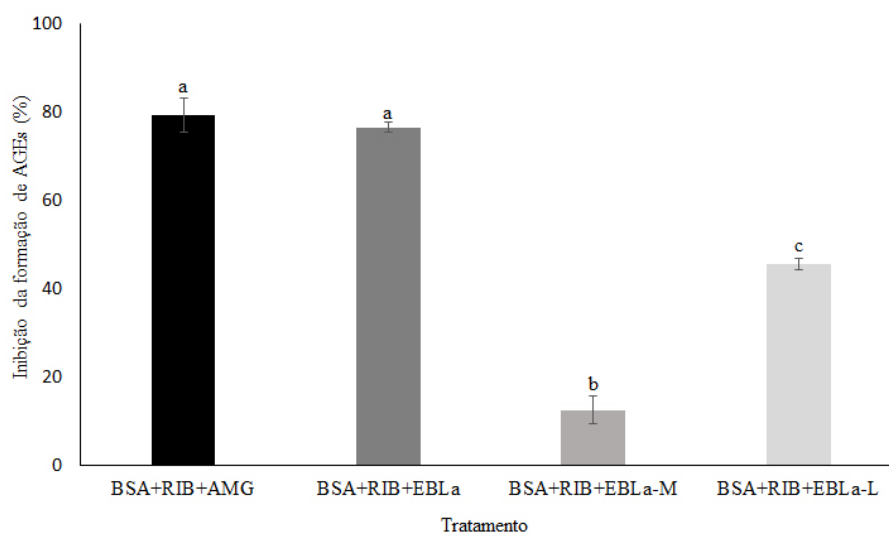


Figura 8 - Inibição da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) do extrato hidrometanólico de *L. aequinoctialis* por fluorescência: BSA = albumina de soro bovino; RIB = ribose; AMG = Aminoguanidina; EBLa = extrato bruto; EBLa-M = extrato bruto microencapsulado e EBLa-L = extrato bruto após a liberação. Letras iguais não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



5.1.2 *Pyropia spiralis*

Os mesmos testes foram realizados para *Pyropia spiralis*, onde o sequestro do radical livre DPPH apresentou resultado de 11,4%, 13,8% e 19,98% para a concentração de 10 mg/mL dos extratos metanólico (Tabela 11), hidrometanólico (Tabela 12) e aquoso

respectivamente. Com objetivo de melhorar esses resultados, foi aumentada as concentrações utilizadas nos testes, porém só foi obtido um aumento na porcentagem de inibição para o extrato aquoso (Tabela 13), sendo 25,3% de sequestro para concentração de 20 mg/mL, enquanto que os outros extratos não apresentaram maior atividade nas concentrações maiores. Esse resultado se confirma pelo estudo de Díaz, et al (2019) que demonstrou atividade de 35,78% de sequestro do radical DPPH para a fração de polissacarídios extraída da espécie *Porphyra umbilicalis*. E Osuna-Ruiz, et al (2016) também utilizou três extratos de diferentes espécies de algas marinhas, demonstrando por meio da EC50 de 16,9 mg/mL, que essa quantidade de antioxidante presentes na alga vermelha *Padina durvillaei* foi capaz de reduzir em 50% do volume inicial de DPPH do teste, além de correlacionar sua atividade com seus compostos ativos, como flavonoides, polifenóis, carotenoides e clorofilas.

Tabela 11 – Atividade antioxidante (DPPH e FRAP) e fenóis totais do extrato metanólico de *Pyropia spiralis*.

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante		Análise fitoquímica
		DPPH ¹	FRAP ²	Fenóis totais ³
Metanólico	1	-	36,84±4,58	6,89
	2	-	58,92±1,98	17,78
	5	2,76±1,92	131,23±2,81	52,56
	10	11,40±1,01	231,92±2,39	103,11

Valores apresentados como média±desvio padrão. ¹ = % Atividade Antioxidante e ² = µMTrolox Equivalente/g de extrato, ³ = Ácido gálico equivalente/g de extrato.

Tabela 12 – Atividade antioxidante (DPPH e FRAP) do extrato hidrometanólico de *Pyropia spiralis*.

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante	
		DPPH ¹	FRAP ²
Hidrometanólico	1	6,07±2,32	54,15±1,41
	2	5,46±1,17	94,53±3,91
	5	9,35±3,05	263,76±5,28
	10	13,81±1,96	305,84±4,48
	20	10,06±2,37	304,61±9,66
	30	8,25±4,73	434,23±14,35

Valores apresentados como média±desvio padrão. ¹ = % Atividade Antioxidante e ² = µMTrolox Equivalente/g de extrato.

Tabela 13 – Atividade antioxidante (DPPH e FRAP) do extrato aquoso de *Pyropia spiralis*.

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante	
		DPPH ¹	FRAP ²
Aquoso	1	0,45±2,75	45,92±0,79
	2	1,95±5,80	84,76±5,04
	5	8,83±3,04	187,30±8,44
	10	19,98±3,30	607,77±1,46
	15	24,47±1,20	841,08±16,82
	20	25,29±1,17	1.100,54±28,19
	25	22,01±2,64	1.223,31±2,93
	30	14,01±1,30	1.322,62±18,15

Valores apresentados como média±desvio padrão. ¹ = % Atividade Antioxidante e ² = μMTrolox Equivalente/g de extrato.

Para o teste FRAP foi obtido um resultado de 231,92 μM/ETg para o extrato metanólico na concentração de 10 mg/mL (Tabela 11), 434,23 μM/ETg para a concentração de 30 mg/mL do extrato hidrometanólico (Tabela 12) e 841,08 μM/ETg na concentração de 15 mg/mL do extrato aquoso (Tabela 13). O estudo feito por López-López, et al (2009), que mostrou o efeito da adição de *Porphyra umbilicalis* em sistemas modelo de emulsão de carne, demonstrando sua atividade antioxidante pelo teste FRAP, apresentou 1,18 μM/ETg, mesmo contendo somente 5,6% dessa alga no sistema. ZHANG et al., 2003 também estudou a influência da fração de polissacarídeos sulfatados de *Porphyra haitanesis* nas consequências da idade em organismos de ratos, e demonstrou que a fração conseguiu diminuir a peroxidação, e aumentar a atividade de enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase e glutathione peroxidase, levando ao aumento da capacidade antioxidantes destes organismos idosos.

O teste de sequestro do óxido nítrico apresentou uma menor quantidade de nitrito formado por mL do extrato aquoso na concentração de 1 mg/mL, que foi de 30,22 μM (Tabela 14), enquanto o extrato hidrometanólico mostrou 63,93 μM (Tabela 15) de nitrito na concentração de 2 mg/mL. Para esta espécie o extrato metanólico não obteve um rendimento suficiente na preparação, devido a isso, a quantidade de amostra desta alga foi utilizada com prioridade para produção dos outros dois extratos, sendo os resultados apresentados a partir desta etapa somente dos extratos aquoso e hidrometanólico. Com isso, para o teste de TBARS, essa macroalga vermelha revelou 20,38% de formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico, que equivale a 79,62% de inibição da peroxidação lipídica na concentração de 1 mg/mL do extrato aquoso (Tabela 14), enquanto o extrato hidrometanólico (Tabela 15) apresentou 56,06% de formação de TBARS, equivalente a 43,94% de inibição na concentração de 5 mg/mL. Este resultado pode ser comparado ao

de Tamura et al. (1998), que demonstraram o potencial antioxidante de diferentes frações do extrato de uma macroalga vermelha (*Porphyra yezoensis*), revelando uma inibição da peroxidação lipídica entre 73% e 98%, sendo a fração de butilhidroxitolueno (BHT) a de maior atividade.

Tabela 14 – Atividade antioxidante (NO e TBARS) do extrato aquoso de *Pyropia spiralis*

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante	
		NO ¹	TBARS ²
Aquoso	1	30,22±0,63	79,62±3,85
	2	34,80±1,68	60,85±3,32
	5	52,47±2,50	56,64±0,67
	10	76,81±1,73	60,85±4,49

Valores apresentados como média±desvio padrão. ¹ = µM de nitrito formado / mL de extrato e ² = % de inibição da peroxidação lipídica.

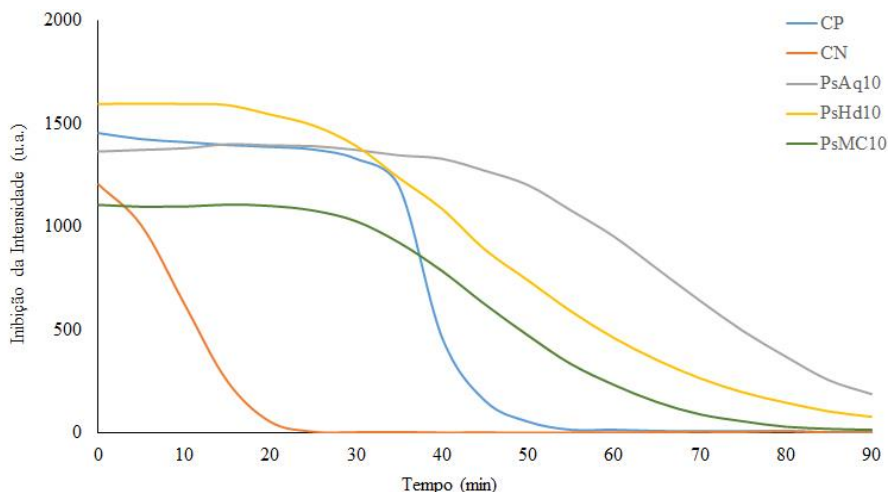
Tabela 15 – Atividade antioxidante (NO e TBARS) do extrato hidrometanólico de *Pyropia spiralis*

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Atividade Antioxidante	
		NO ¹	TBARS ²
Hidrometanólico	1	72,93±6,52	43,28±0,49
	2	63,93±4,25	41,97±1,05
	5	74,40±1,71	43,94±2,45
	10	76,96±4,26	42,30±8,16

Valores apresentados como média±desvio padrão. ¹ = µM de nitrito formado / mL de extrato e ² = % de inibição da peroxidação lipídica.

Para o teste de capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), tanto o extrato aquoso quanto o hidrometanólico demonstraram potencial de atividade de captura destes radicais, como pode ser observado no gráfico da Figura 9, o extrato hidrometanólico apresentou maior intensidade de ação, sendo maior até do que o controle positivo, porém o extrato aquoso permaneceu com eficiência de ação por um período maior de tempo, além de apresentar uma intensidade de atividade semelhante ao trolox, o que significa que este extrato foi capaz de capturar uma maior quantidade de radicais de oxigênio na mesma concentração que o extrato hidrometanólico, por isso permaneceu com a ação por mais tempo.

Figura 9 - Medição por alterações na intensidade da fluoresceína de 0 a 90 minutos. Efeito de diferentes concentrações de extratos de *Pyropia spiralis* (Nori do Brasil) (PsAq10 = extrato aquoso a 10 mg/mL e PsHd10 = extrato hidrometanólico a 10 mg/mL), PsMC10 = extrato microencapsulado (10 mg/mL) e Trolox (controle positivo) na curva de decaimento.



Já para as análises fitoquímicas da Nori do Brasil, o extrato aquoso apresentou 548 mgEAG/mL de extrato na concentração de 30 mg/mL (Tabela 16), representando a quantidade de polifenóis totais presentes nesta espécie, enquanto que a determinação de compostos fenólicos específicos como os flavonoides, este extrato revelou 219,375 mgEQR/mL de extrato nesta mesma concentração (Tabela 16). O extrato hidrometanólico apresentou maiores resultados fitoquímicos para a concentração de 10 mg/mL, onde foi obtido 226,11 mgEAG/mL de extrato para os compostos fenólicos totais (Tabela 17) e 25,875 mgEQR/mL de extrato quando quantificado o total de flavonoides dentro destes polifenóis (Tabela 17). Como a obtenção do extrato metanólico apresentou dificuldades para ter um rendimento que suprisse a necessidade de aumentar a concentração para os testes, não pôde ser identificado a quantidade de flavonoides presentes neste tipo de extração, pois os resultados nas concentrações de até 10 mg/mL não demonstraram presença destes compostos, porém o teste de determinação dos compostos fenólicos totais quantificou 103,11 mgEAG/mL de extrato para a maior concentração avaliada (Tabela 11).

A necessidade de aumentar a concentração dos extratos estudados para esta espécie, em alguns testes, provavelmente é devido à sua composição metabólica, que se faz em maior quantidade de metabólitos primários, como proteínas, lipídios e carboidratos, e menos em metabólitos secundários, como os flavonoides, que normalmente são responsáveis pelo potencial de atividade das plantas, pois são compostos formados devido ao estresse ambiental que a planta pode sofrer, agindo como defesa e proteção. Por esse

motivo também se explica os melhores resultados vindos do extrato aquoso, uma vez que os metabólitos primários possuem a característica de serem melhores extraídos por solventes de maior polaridade, como a água, gerando um extrato rico em compostos como os polissacarídeos e carotenoides, que também apresentam potencial de atividade biológica.

Tabela 16 – Determinação dos teores totais de fenóis e flavonoides no extrato aquoso de *Pyropia spiralis*.

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Análises fitoquímicas	
		Fenóis totais ¹	Flavonoides ²
Aquoso	1	14,78	-
	2	35,78	-
	5	92,11	-
	10	185	-
	15	234,33	40,375
	20	357,55	59
	25	389,78	112,625
	30	548	219,375

¹ = mg de Ácido gálico equivalente/g de extrato; ² = mg de Rutina equivalente/g de extrato

Tabela 17 – Determinação dos teores totais de fenóis e flavonoides no extrato hidrometanólico de *Pyropia spiralis*.

Extrato	Concentração (mg/mL ⁻¹)	Análises fitoquímicas	
		Fenóis totais ¹	Flavonoides ²
Hidrometanólico	1	28,22	-
	2	57,11	-
	5	188,11	-
	10	226,11	25,875

¹ = mg de Ácido gálico equivalente/g de extrato; ² = mg de Rutina equivalente/g de extrato

Os resultados obtidos podem ser comparados ao de Osuna-Ruiz, et al (2016) que apresentou 0,97 mgEAG/100 mg do extrato metanólico de *P. durvillaei*, para quantidade de compostos fenólicos presentes na amostra, e 14,3 mg equivalentes a quercetina por grama de extrato para os flavonoides totais. Além disso, o estudo sobre o sistema de emulsão de carne com adição de *Porphyra umbilicalis* de López-López, et al (2009) também demonstrou a presença de 2170 mgEAG/100 g de amostra para o conteúdo de polifenóis totais, que está relacionado ao aumento da capacidade antioxidante das emulsões, determinadas pelo teste FRAP.

A composição mineral e quantificação de proteínas totais está expresso na Tabela 10, que, ao contrário dos resultados para *Lemna*, o extrato de *Pyropia spiralis* apresentou uma maior quantidade de potássio (25 g/kg), seguida de nitrogênio (10,7 g/kg), com

quantidades significativas de ferro em sua composição, além de demonstrar 66,9 g/kg de proteínas totais para esta planta.

Após comprovação da atividade antioxidante, foram obtidos resultados para os testes de atividade antiglicante com o extrato que apresentou melhores resultados, sendo este o extrato aquoso. Com isso, para a determinação dos grupos aminos-livres foi demonstrado 100% de inibição da glicação, enquanto que o teste de MRE (Figura 10) demonstrou uma atividade antiglicante significativa, onde a banda correspondente ao extrato bruto (1) apresentou menos sinais de arraste da proteína, em comparação com a banda contendo a proteína glicada (B), além de se apresentar de maneira semelhante a banda contendo a AMG (C), resultado que foi confirmado pelo teste de inibição da formação de AGEs (Figura 11) que demonstrou uma atividade de inibição significativa, mesmo que tenha diferido estatisticamente da amostra controle, com a AMG.

Figura 10 – MRE do extrato aquoso de *Pyropia spiralis* (1 - BSA, 2 - BSA + Ribose, 3 - BSA + Ribose + AMG, 4 - extrato bruto, 5 - microcápsula sem liberação dos compostos, 6 - microcápsulas após liberação dos compostos).

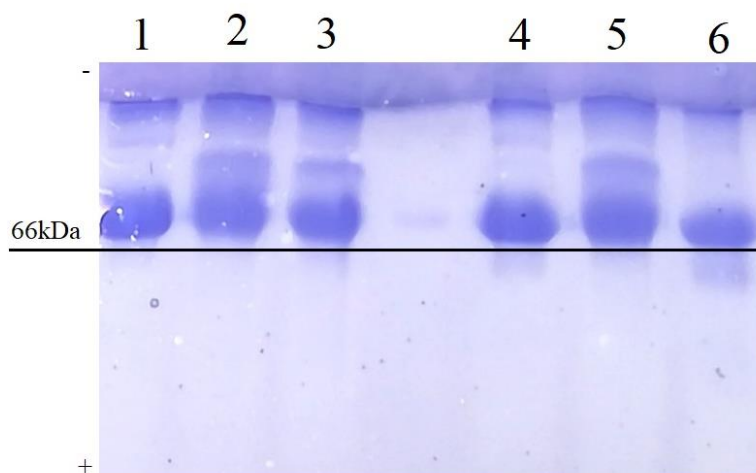
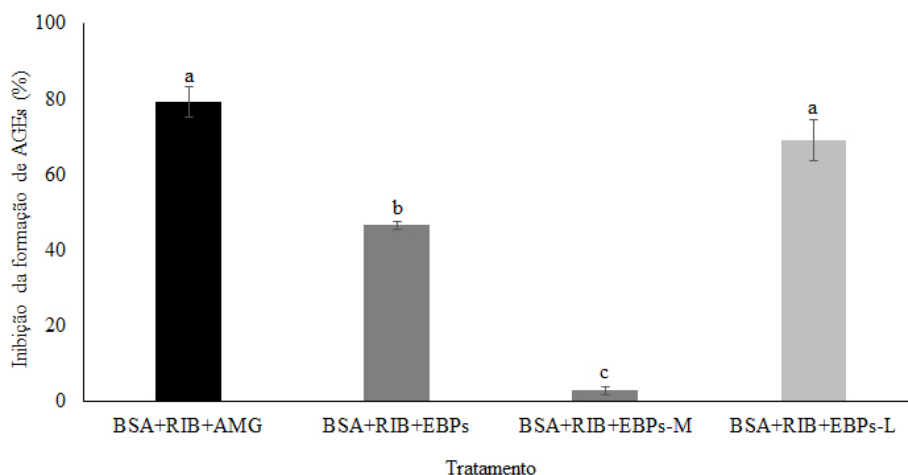


Figura 11 - Inibição da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs) do extrato aquoso de *Pyropia spiralis* por fluorescência: BSA = albumina de soro bovino; RIB = ribose; AMG = Aminoguanidina; EBPs= extrato bruto; EBPs-M = extrato bruto microencapsulado e EBPs-L = extrato bruto após a liberação. Letras iguais não diferiram estatisticamente pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).



5.2 Resultados após a encapsulação dos extratos

A partir da análise e comparação dos resultados obtidos entre os extratos das duas espécies, foram escolhidos um extrato de cada espécie, sendo estes que apresentaram melhores resultados para os testes estudados, com intuito de realizar o processo de microencapsulação e comparar os resultados obtidos no extrato bruto e após a liberação de seus compostos encapsulados. Sendo assim, a microencapsulação foi feita com os extratos hidrometanólico de *Lemna aequinoctialis* e aquoso de *Pyropia spiralis*.

Após o processo de encapsulação dos extratos escolhidos, foram feitos testes de quantificação dos compostos fenólicos e sequestro do DPPH para comprovar o sucesso na incorporação dos compostos pela maltodextrina, não apresentando resultados significativos para nenhum dos dois testes, mostrando que o processo ocorreu como esperado. Além disso, o teste de polifenóis foi utilizado para identificar a eficiência das encapsulações por meio da comparação entre a quantidade desses compostos no extrato bruto, ou seja, sem encapsulação, na superfície das microcápsulas, ou seja, os compostos que não foram encapsulados no processo e a quantidade após a ruptura e liberação dessas microcápsulas, onde os resultados de eficiência estão apresentados na tabela 18.

Tabela 18 - Eficiência de encapsulação dos extratos hidrometanólico de *Lemna aequinoctialis* e aquoso de *Pyropia spiralis* por determinação de polifenóis totais

Extrato	(g) + MD20 (g)	Fenóis totais			EM %
		FT	FS	ST	
<i>L. aequinoctialis</i>	0,5 + 5	529,11	0,00	11,22	2,12
<i>P. spiralis</i>	0,5 + 5	573,89	3,22	86,11	14,44
MD20	0,0 + 10	-	-	-	-

MD20 = maltodextrina DE20; FT = compostos fenólicos não encapsulados antes da liofilização; FS = compostos fenólicos encapsulados em microcápsulas após liofilização; ST = compostos fenólicos após liberação; EM = eficiência de microencapsulação.

Feito a liberação dos compostos encapsulados, foram realizados os testes de ação antioxidante, por meio do sequestro do radical DPPH, poder de redução do íon ferro (FRAP), e capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC), atividade antiglicante pelos testes de MRE, determinação do grupos amino-livres e inibição da formação de AGEs, além da quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides presentes nas microcápsulas produzidas, todos feitos nas melhores concentrações obtidas pelos resultados nos extratos brutos.

Como resultados para a atividade antioxidante, as microcápsulas do extrato hidrometanólico de *L. aequinoctialis* revelou 31,7% de sequestro do radical DPPH e 258,84 µM equivalentes ao Trolox por grama de extrato para o teste FRAP (Tabela 18), e as microcápsulas do extrato aquoso de *Pyropia spiralis* apresentou 32,3% de sequestro do DPPH e 110,08 µMET/g de extrato para o teste FRAP (Tabela 19). Já para as análises fitoquímicas as microcápsulas mostraram quantidades baixas de compostos fenólicos e nenhuma quantidade de flavonoides para as duas espécies (Tabela 20).

O ORAC demonstrou uma menor eficiência de captura dos radicais para as microcápsulas de *L. aequinoctialis* (Figura 6), quando comparado as amostras do extrato e de controle, porém, as microcápsulas se mantiveram estáveis por um longo período de tempo, sendo que até os minutos finais do teste, esta continuou apresentando atividade antioxidante, diferente dos extratos brutos que perderam sua eficiência. Enquanto que as microcápsulas de *P. spiralis* (Figura 9) demonstraram ação significativa de captura dos radicais de oxigênio, porém se mostrou menor quando comparada aos extratos e ao controle, mantendo sua eficiência e estabilidade de sua atividade por tempo prolongado, semelhante ao tempo das outras amostras comparadas.

Tabela 19 - Determinação da atividade antioxidante por meio dos testes DPPH e FRAP dos extratos hidrometanólico de *Lemna aequinoctialis* e aquoso de *Pyropia spiralis* encapsulado e após a liberação das microcápsulas

Extrato	(g) + MD20 (g)	Antioxidante		
		Encapsulado	Liberado	
		DPPH (%)	DPPH ¹	FRAP ²
<i>L. aequinoctialis</i>	0,5 + 5	0	31,7	258,84
<i>P. spiralis</i>	0,5 + 5	0	32,3	110,08
Ácido gálico* (100 µg/mL)		84.56±0.01		
Trolox* (140 µg/mL)				49.59±0.00

¹ = % Atividade Antioxidante; ² = µM Trolox Equivalente / g de extrato. *Padrões utilizados como referência no teste do DPPH e FRAP.

Tabela 20 - Quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides das microcápsulas produzidas com os extratos hidrometanólico de *Lemna aequinoctialis* e aquoso de *Pyropia spiralis*

Extrato	(g) + MD20 (g)	Compostos Liberados	
		Polifenóis ¹	Flavonoides ²
		Totais	Totais
<i>L. aequinoctialis</i>	0,5 + 5	11,22	0,00
<i>P. spiralis</i>	0,5 + 5	86,11	0,00

¹ = mg equivalente a ácido gálico por g de extrato seco; ² = mg equivalente a rutina por g de extrato seco.

Para atividade antiglicante, as microcápsulas produzidas dos extratos das duas espécies apresentaram resultados significativos, onde os compostos liberados da microcápsula do extrato hidrometanólico de *L. aequinoctialis* obteve um valor de 37,30% de inibição da glicação pelo teste de aminas-livres, e os compostos liberados do extrato aquoso de *P. spiralis* apresentaram 65,86% de inibição, também para este teste. Enquanto que as bandas de corrida correspondentes aos compostos liberados das microcápsulas (6 nas Figuras 7 e 10) para o teste de MRE se mostraram, não apenas semelhantes as bandas do extrato bruto e da AMG, como apresentaram uma característica de arraste mais limpo do que destas bandas de referência. Outro resultado que pode ser observado é em relação ao teste de inibição da formação de AGEs, onde os compostos liberados pelas microcápsulas de *L. aequinoctialis* demonstraram atividade de inibição significativa, porém estatisticamente menor quando comparada as amostras de controle (AMG) e do extrato bruto (Figura 8), enquanto que para os compostos das microcápsulas de *P. spiralis*, o potencial de atividade foi melhor do que do seu extrato bruto, sendo estatisticamente semelhante a amostra com AMG (Figura 11).

Isso mostra que mesmo as microcápsulas obtidas apresentarem quantidades menores de compostos fenólicos, quando comparadas as quantidades obtidas dos extratos brutos, estas permaneceram com seu potencial tanto antioxidante quanto antiglicante após

encapsulação dos seus compostos. Além disso, os resultados obtidos podem ser interpretados de maneira positiva em relação a encapsulação, uma vez que mesmo contendo uma baixa quantidade de composto, as microcápsulas continuaram demonstrando atividade biológica significativa, revelando que o processo de encapsulação pode proporcionar uma melhora no potencial dos extratos, precisando de menos compostos para obter uma atividade biológica semelhante.

5.3 Caracterização das microcápsulas

A caracterização referente ao tamanho das partículas, índice de polidispersão e potencial zeta foram feitos pela técnica de DLS que se baseia na difusão Browniana para medir o tamanho de partículas em suspensão ou emulsão. Essa técnica permite a determinação do diâmetro hidrodinâmico das partículas por meio da análise da intensidade do espalhamento de luz provocada pelo movimento dessas partículas. É amplamente utilizada na caracterização de nanopartículas, devido à sua capacidade de fornecer informações precisas e reprodutíveis sobre o tamanho, distribuição de tamanho e potencial zeta das partículas.

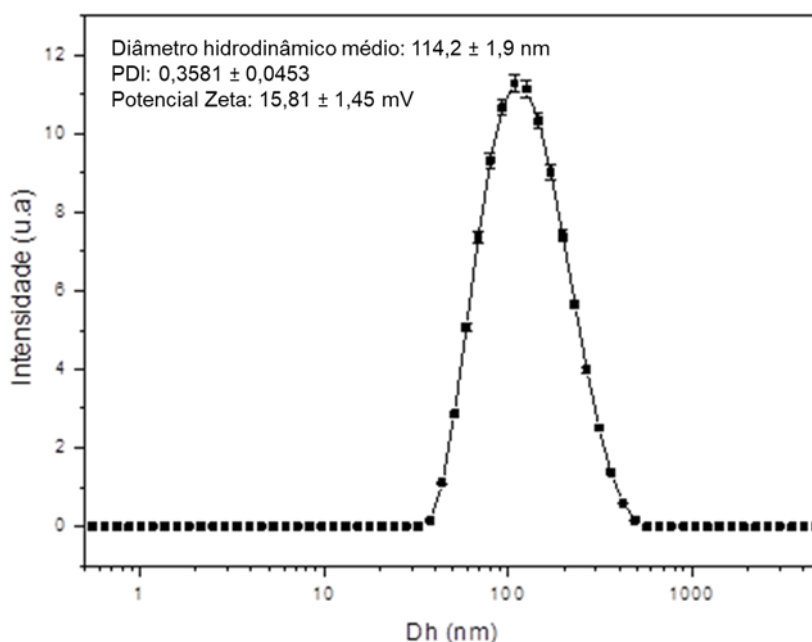
Analisando os gráficos que são gerados por esta técnica, o número de picos pode indicar a existência de uma ou mais populações de partículas, a existência de múltiplos picos pode sugerir a existência de partículas de diferentes tamanhos e/ou agregações. A posição dos picos na figura revela o tamanho médio das partículas. A largura dos picos é um indicador da polidispersão dos tamanhos de partículas, onde picos mais largos sugerem uma maior variação de tamanho. De maneira qualitativa, a altura dos picos, corresponde à intensidade do espalhamento de luz, refletindo o aumento ou a diminuição da contribuição de uma população de partículas.

5.3.1 *Lemna aequinoctialis*

A distribuição de tamanho das microcápsulas de *Lemna aequinoctialis* (0,001 g/ml) em tampão fosfato 20 mmol/L pH 7,0 á 25°C estão apresentados na Figura 12, onde mostra que o tamanho médio das partículas são de $114,2 \pm 1,9$ nm, com um índice de polidispersão (PDI) de $0,3581 \pm 0,0453$, sendo que os valores de PDI podem variar de 0 a 1. Além disso, o valor de potencial zeta encontrado para esta amostra foi de $15,81 \pm 1,45$ mV. Com isso, é possível observar que os compostos encapsulados podem ser classificados como

nanocápsulas, devido ao seu diâmetro médio ser menor que $0,2\ \mu\text{m}$, e estas são pouco polidispersas, ou seja, apresentam uma variedade de tamanhos, porém a presença de um único pico de contribuição demonstra uma baixa variação de Dh. Nas análises por intensidade de espalhamento (Figura 12) a maioria das partículas tem tamanhos entre 45 e 380 nm, sendo que a maior intensidade ocorre em torno de 100-110nm. Além disso, nota-se que há uma diminuição gradual da intensidade conforme as partículas aumentam de tamanho.

Figura 12 - Diâmetro hidrodinâmico de microcápsula de *Lemna aequinoctialis* (0,001 g/ml) em tampão fosfato 20 mmol/L pH 7,0 obtido por DLS e analisado pela intensidade de espalhamento das partículas.



Na Tabela 21 é apresentado a média das 20 medidas de DLS analisadas para as microcápsulas de *Lemna aequinoctialis* (0,001 g/ml) extraídos diretamente do software do DLS. Como pode ser observado a contribuição do pico 1 corresponde à 99,65% da intensidade de espalhamento de luz, sendo caracterizado pela quantidade quase total das partículas em suspensão.

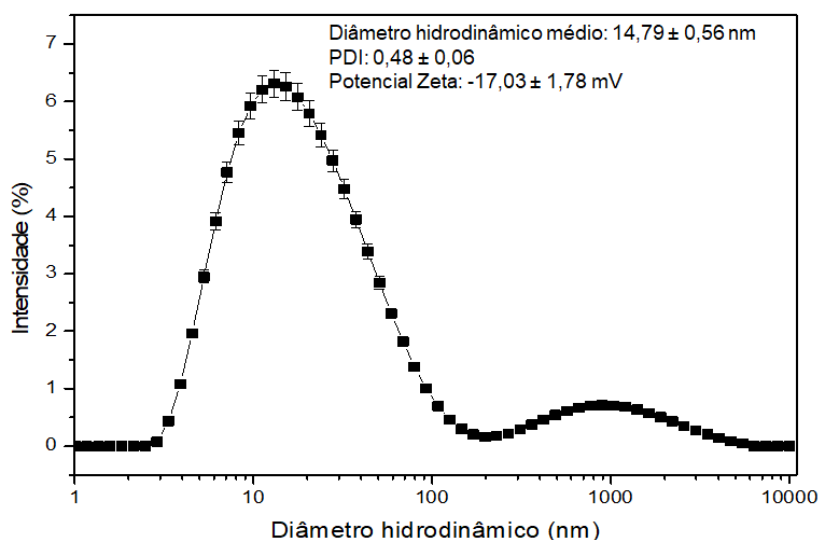
Tabela 21. Média de 20 medidas de DLS analisadas para a *Lemna aequinoctialis* (0,001 g/ml) extraídos diretamente do software do DLS.

Análise	Média ± Desvio Padrão
Tamanho (nm)	114,2±1,9
Índice de Polidispersão	0,3581±0,0453
Pico 1 média de intensidade por área (nm)	134,1±3,863
Pico 1 Área por intensidade por área (%)	99,65±0,9845

5.3.2 *Pyropia spiralis*

A caracterização das microcápsulas de *Pyropia spiralis* (0,001 g/mL) em tampão fosfato 20 mM pH 7,0 está representada pela Figura 13, que apresenta os dados de DLS obtidos a partir de uma média de 20 medições a 25°C. Os valores de Dh, PDI e potencial zeta foram $14,79 \pm 0,56$ nm; $0,48 \pm 0,06$ e $-17,03 \pm 1,78$ mV respectivamente. Pode ser observado também que os compostos encapsulados são classificados como nanocápsulas, mesmo que uma pequena parte das partículas sejam da faixa de 1 μ m, a maior parte estão na escala de nano. Estas são caracterizadas por serem polidispersas, com uma variedade de tamanhos, com dois picos de contribuições, porém com índice de polidispersão baixo, sendo a maioria das nanopartículas ocorre entre 10 e 100 nm.

Figura 13 - Diâmetro hidrodinâmico de microcápsula de *Pyropia spiralis* (0,001 g/mL) em tampão fosfato 20 mmol/L pH 7,0 obtido por DLS e analisado pela intensidade de espalhamento das partículas.



Na Tabela 22 é apresentado a média das 20 medidas de DLS analisadas para a *Pyropia spiralis* (0,001 g/mL) extraídos diretamente do software do DLS. Como pode ser observado a contribuição do pico 1 corresponde à 83,18% da intensidade de espalhamento de luz, e o pico 2 corresponde à 15,92% das espécies em solução.

Tabela 22. Média de 20 medidas de DLS analisadas para a *Pyropia spiralis* (0,001 g/mL) extraídos diretamente do software do DLS.

Análise	Média ± Desvio Padrão
Tamanho (nm)	14,79±0,5629
Índice de Polidispersão	0,4783±0,06477
Pico 1 média de intensidade por área (nm)	19,65±1,989
Pico 1 Área por intensidade por área (%)	83,18±3,756
Pico 2 média de intensidade por área (nm)	485,4±245,2
Pico 2 Área por intensidade por área (%)	15,92±2,655

6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no estudo é possível concluir que as espécies estudadas (*Lemna aequinoctialis* e *Pyropia spiralis*) são promissoras fontes de princípios bioativos com relevância farmacológica e/ou nutricional, principalmente com ação antioxidante e antiglicante, mitigando os danos ocasionados pelo estresse oxidativo e da glicação proteica, além da presença desses metabólitos secundários, somado a outros compostos como minerais e proteínas. Os extratos destas espécies mostraram-se passíveis de serem encapsulados por maltodextrina DE20 dando origem a produtos micro e nanoestruturados que após liberação mantiveram ou mesmo aumentaram as atividades antioxidante e antiglicante avaliadas por diferentes testes *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- AASIM, M.; BAKHSH, A.; SAMEEULLAH, M.; KARATAŞ, M.; KHAWAR, K. M. Aquatic Plants as Human Food. **Global Perspectives on Underutilized Crops**, p.165–187, 2018.
- ALI, M.; SUKIRNO, TAMZIL, M. H. ICHSAN, M. Meat Traits of Muscovy Ducks Fed on Phytonutrition Meal. **International Journal of Poultry Science**, v.13, n. 4, p. 204-207, 2014.
- AMES, B. N.; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 7915-7922, set. 1993.

ANDRIANI, Y.; MULYANI, Y.; ISKANDAR; MEGANTARA, S.; LEVITA, J.. Molecular docking study, antioxidant activity, proximate content, and total phenol of *Lemna perpusilla* Torr. Grown in sumedang, west Java, Indonesia. **Rasayan Journal Of Chemistry**, v. 15, n. 02, p. 1182-1189, 2022.

ARAUJO-DÍAZ, S.; LEYVA-PORRAS, C.; AGUIRRE-BAÑUELOS, P.; ÁLVAREZ-SALAS, C.; SAAVEDRA-LEOS, Z. Evaluation of the physical properties and conservation of the antioxidants content, employing inulin and maltodextrin in the spray drying of blueberry juice. **Carbohydr. Polym.**, 167, 317–325, 2017.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, mar. 2005.

APPENROTH, K.-J.; SREE, K. S.; BÖHM, V.; HAMMANN, S.; VETTER, W.; LEITERER, M.; JAHREIS, G. Nutritional value of duckweeds (Lemnaceae) as human food. **Food Chemistry**, v. 217, p. 266–273, 2017.

BASTOS, D. H. M.; SHIBAO, J.; FERREIRA, E. L.; BOMBO, A. J. Produtos da reação de Maillard em alimentos. **Nutrire: revista da sociedade brasileira de alimentação e nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition.**, São Paulo, SP, v. 36, n. 3, p. 63-78, dez. 2011.

Blois MS. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v.181, p1199–1200, 1958.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 4, n. 23, p. 629-643, ago. 2010.

BHATIA, S.; RATHEE, P.; SHARMA, K.; CHAUGULE, B. B.; KAR, N.; BERA, T. Immuno-modulation effect of sulphated polysaccharide (porphyran) from *Porphyra vietnamensis*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 57, p. 50–56, 2013.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, ago. 1999.

BITO, T.; TENG, F.; WATANABE, F. Bioactive Compounds of Edible Purple Laver *Porphyra* sp. (Nori). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 49, p.10685–10692, 2017.

BOKHARI, S. H.; AHMAD, I.; MAHMOOD-UL-HASSAN, M.; MOHAMMAD, A. Phytoremediation potential of *Lemna minor* L. for heavy metals. **International Journal of Phytoremediation**, v. 18, n.1, p. 25–32, 2015.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** v. 72, 243-254, 1976.

CORNISH, M. L.; GARBARY, D. J. Antioxidants from macroalgae: potential applications in human health and nutrition. **Algae**, v. 25, n. 4, p. 155-171, 2010.

COSTA, L. S. Atividades biológicas de polissacarídeos sulfatados extraídos da alga vermelha *Gracilaria caudata*. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Bioquímica, **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, Natal, 2008.

DREHER, D.; JUNOD, A. F. Role of Oxygen Free Radicals in Cancer Development. **European Journal of Cancer**, v. 32, n. 1, p. 30-38, 1996.

DÍAZ, R. T. A.; ARROJO, V. C.; AGUDO, M. A. A.; CÁRDENAS, C.; DOBRETSOV, S.; FIGUEROA, F. L.. Immunomodulatory and Antioxidant Activities of Sulfated Polysaccharides from *Laminaria ochroleuca*, *Porphyra umbilicalis*, and *Gelidium corneum*. **Marine Biotechnology**, v. 21, n. 4, p. 577-587, 27 jun. 2019.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Botucatu, v. 43, n. 1, p. 61-68, maio 1997.

FRANCISQUINI, J. D'; MARTINS, E.; SILVA, P. H. F.; SCHUCK, P.; PERRONE, Í. T.; CARVALHO, A. F. Reação de Maillard: uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 72, n. 1, p. 48-58, 21 nov. 2017.

FREIBERG, S.; ZHU, X. X. Polymer microspheres for controlled drug release. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 282, p. 1-18, abr. 2004.

FUJIWARA, M.; SHIOKAWA, K.; KUBOTA, T. Direct encapsulation of proteins into calcium silicate microparticles by water/oil/water interfacial reaction method and their responsive release behaviors. **Materials Science And Engineering C**, v. 32, p. 2484-2490, 2012.

GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. Embrapa Pantanal-Circular Técnica (INFOTECA-E), 2006.

GHADIRYANFAR, M.; ROSENTRATER, K. A.; KEYHANI, A.; OMID, M. A review of macroalgae production, with potential applications in biofuels and bioenergy. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 54, p. 473-481, 2016.

GÜLÇİN, I.; KURECCI, E.; AKKENIK, E.; TOPAL, F.; HISAR, O. Antioxidant, Antibacterial and Anticandidal Activities of Aquatic Plant: Duckweed (*Lemna minor* L. Lemnaceae). **Turkish Journal of Biology**, v. 34, p. 175-188, 2010.

GUIMARÃES, A. G.; OLIVEIRA, G. F.; MELO, M. S.; CAVALCANTI, S. C.; ANTONIOLLI, A. R.; BONJARDIM, L. R.; SILVA, F. A.; SANTOS, J. P.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C.; ARAÚJO, A. A.; GELAINN, D. P.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Bioassay-guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.107, n.6, p.949–957 2010.

GÜLÇİN, I.; KURECCI, E.; AKKENIK, E.; TOPAL, F.; HISAR, O. Antioxidant, Antibacterial and Anticandidal Activities of Aquatic Plant: Duckweed (*Lemna minor* L. Lemnaceae). **Turkish Journal of Biology**, v. 34, p. 175-188, 2010.

HELLWIG, M.; HENLE, T. Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of the Maillard Reaction. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 53, p. 10316-10329, 2014.

HOU, W.; CHEN, X.; SONG, G.; WANG, Q.; & CHI CHANG, C. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). **Plant Physiology and Biochemistry**, v 45, n. 1, p. 62–69, 2007.

ISAKA, S.; CHO, K.; NAKAZONO, S.; ABU, R.; UENO, M.; KIM, D.; ODA, T. Antioxidant and anti-inflammatory activities of porphyran isolated from discolored nori (*Porphyra yezoensis*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 68–75, 2015.

ISHIHARA, K.; OYAMADA, C.; MATSUSHIMA, R.; MURATA, M.; MURAOKA, T. Inhibitory effect of porphyran, prepared from dried “Nori”, on contact hypersensitivity in mice. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 69, p. 1824–1830, 2005.

KAMMEYER, A.; LUITEN, R.M. Oxidation events and skin aging. **Ageing Research Reviews**, v. 21, p. 16-29, jan. 2015.

KHURANA, A.; KHURANA, J. P.; BABBAR, S. B. Nitric Oxide Induces Flowering in the Duckweed *Lemna aequinoctialis* Welw. (Syn. *L. paucicostata* Hegelm.) Under Noninductive Conditions. **Journal Of Plant Growth Regulation**, v. 30, n. 3, p. 378-385, 2011.

KUANG, S. S.; OLIVEIRA, J. C.; CREAN, A. M. Microencapsulation as a Tool for Incorporating Bioactive Ingredients into Food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 10, p. 951-968, 2010.

KUKIC, J.; POPOVIC, V.; PETROVIC, S.; MUCAJI, P.; CIRIC, A.; STOJKOVIC, D.; SOKOVIC, M. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cynara cardunculus* extracts. **Food Chemistry**, v. 107, n. 2, p. 861-868, 2008.

LIU, Y.; XU, H.; YU, C.; ZHOU, G. Multifaceted roles of duckweed in aquatic phytoremediation and bioproducts synthesis. **Gcb Bioenergy**, v. 13, n. 1, p. 70-82, 30 set. 2020

LEDESMA-OSUNA, A.I.; RAMOS-CLAMONT, G.; VÁZQUEZ-MORENO, L. Characterization of bovine serum albumin glycosylated with glucose, galactose and lactose. **Acta Biochimica Polonica**. v.55, n.3, p.491-497, 2008.

LÓPEZ-LÓPEZ, I.; BASTIDA, S.; RUIZ-CAPILLAS, C.; BRAVO, L.; LARREA, M.T.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.; COFRADES, S.; JIMÉNEZ-COLMENERO, F.. Composition and antioxidant capacity of low-salt meat emulsion model systems containing edible seaweeds. **Meat Science**, v. 83, n. 3, p. 492-498, nov. 2009.

MARCOCCI, L. et al. The Nitric Oxide-Scavenging Properties of Ginkgo Biloba Extract EGB 761. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 201, n. 2, p.748-755, jun. 1994.

MALAVOLTA, E. ; VITTI, G. C. & OLIVEIRA, S. A. Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações. 2.ed., rev. e atual., Piracicaba: POTAFÓS, 1997. 319p

MARQUES, A.; FERREIRA, J.; ABREU, H.; PEREIRA, R.; REGO, A.; SERÔDIO, J.; PACHECO, M. Searching for antigenotoxic properties of marine macroalgae dietary

supplementation against endogenous and exogenous challenges. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, part A, p. 1–18, 2018.

MESQUITA, S. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: Propriedades, Aplicações e Mercado. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p. 672-688, abr. 2017.

MILSTEIN, D.; MEDEIROS, A. S.; OLIVEIRA, E. C.; OLIVEIRA, M. C. Native or introduced? A re-evaluation of *Pyropia* species (Bangiales, Rhodophyta) from Brazil based on molecular analyses. **European Journal Of Phycology**, v. 50, n. 1, p. 37-45, 16 dez. 2014.

MIURA, S.; WATANABE, J.; TOMITA, T.; SANO, M.; TOMITA, I. The inhibitory of tea polyphenols (flavan-3-ol derivatives) on Cu²⁺ mediated oxidative modification of low density lipoprotein. **Biol Pharm Bull.** v.17, n.12, p.1567-1572, 1994.

MORA-HUERTAS, C.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 385, p. 113-142, 2010.

MOREIRA, A. S.; GONZÁLEZ-TORRES, L.; OLIVERO-DAVID, R.; BASTIDA, S.; BENEDI, J.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. Wakame and nori in restructured meats included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in wistar rats. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 3, p. 290–298, 2010.

OKAI, Y.; HIGASHI-OKAI, K.; YANO, Y.; OTANI, S. Identification of antimutagenic substances in an extract of edible red alga, *Porphyra tenera* (Asadusa-nori). **Cancer Letters**, v.100, n.1-2, p.235–240, 1996.

OLANIYI, C. O.; OLADUNJAYE, I. O. Replacement Value of duckweed (*Lemna minor*) in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) Diet. **Transnational Journal of Science and Technology**, v. 2, n. 9, p. 54-61, 2012.

OLORUNFEMI, T. O. S.; ADERIBIGBE, F. M.; ALESE, B. K.; FASAKIN, E. A. Utilization of Duckweed (*Lemna paucicostata*) in Least-cost Feed Formulation for Broiler Starter: A Linear Programming Analysis. **Information Technology Journal**, v. 5, p. 166-171, 2006.

OSUNA-RUIZ, I.; LÓPEZ-SÁIZ, C.-M.; BURGOS-HERNÁNDEZ, A.; VELÁZQUEZ, C.; NIEVES-SOTO, M.; HURTADO-OLIVA, M. A. Antioxidant, antimutagenic and antiproliferative activities in selected seaweed species from Sinaloa, Mexico. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 10, p. 2196–2210, 2016.

PAGLIUSO, D.; JARA, C. E. P.; GRANDIS, A.; LAM, E.; FERREIRA, M. J. P.; BUCKERIDGE, M. S. Flavonoids from duckweeds: potential applications in the human diet. **Rsc Advances**, v. 10, n. 73, p. 44981-44988, out. 2020.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal Of Nutritional Science**, Cambridge, v. 5, p. 1-15, 2016.

PASHAEI, R. Features of Apigenin, Luteolin, Hesperetin and Naringenin in Crop and Body. **International Journal Of Food Science, Nutrition And Dietetics**, v. 5, n. 6, p. 300-304, 16 jun. 2016.

PEREIRA, K. C.; FERREIRA, D. C. M.; ALVARENGA, G. F.; PEREIRA, M. S. S.; BARCELOS, M. C. S.; COSTA, J. M. G. Microencapsulation and release controlled by the diffusion of food ingredients produced by spray drying: a review. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, e2017083, 2018.

PIRES, J. S.; TORRES, P. B.; CHOW, F.; SANTOS, D. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. DOI:10.13140/RG.2.2.29127.80809. 2017.

PIRES, J.; TORRES, P. B.; CHOW, F.; SANTOS, D. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. DOI: 10.13140/RG.2.2.27450.08640. 2017.

POOJA, K.; RANI, S.; RANA, V.; PAL, G. K. Aquatic plants as a natural source of antimicrobial and functional ingredients. **Functional and Preservative Properties of Phytochemicals**, p. 93-118, 2020.

PLAZONIĆ, A.; BUCAR, F.; MALEĽ, Ž.; MORNAR, A.; NIGOVIĆ, B.; KUJUNDŽIĆ, N. Identification and Quantification of Flavonoids and Phenolic Acids in Burr Parsley (*Caucalis platycarpos* L.), Using High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection and Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2466-2490, 9 jul. 2009.

RAMOS, N. S. Descrição da atividade antioxidante de polissacarídeos sulfatados com estrutura química elucidada do gênero *Gracilaria*: uma revisão da literatura. 54 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Macaé, 2022.

RAZINGER, J.; DERMASTIA, M.; DRINOVEC, L.; DROBNE, D.; ZRIMEC, A.; DOLENC KOCE, J. Antioxidative responses of duckweed (*Lemna minor* L.) to short-term copper exposure. **Environmental Science and Pollution Research - International**, v. 14, n. 3, p. 194–201, 2007.

ROBERT, P.; GORENA, T.; ROMERO, N.; SEPUVEDA, E.; CHAVEZ, J.; SAENZ, C. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. **International Journal Food Science & Technology**, v. 45, p. 1386-1494, 2010.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C.; A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 1, n. 27, p. 53-60, mar. 2007.

SALLAH-UD-DIN, R.; FARID, M.; SAEED, R.; ALI, S.; RIZWAN, M.; TAUQEER, H. M.; BUKHARI, S. A. H. Citric acid enhanced the antioxidant defense system and chromium uptake by *Lemna minor* L. grown in hydroponics under Cr stress. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 21, p. 17669–17678, 2017.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.3, n.16, p.26-30, 2000.

SIES, H.; STAHL W. and SEVANIAN A. Nutritional, Dietary and Postprandial Oxidative Stress. **American Society For Nutritional Sciences**, v. 135, p. 969-972, fev. 2005.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, set. 2010.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, É. F.; BASTOS, J. O.; SILVA, C. B. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, p. 1304-1311, jul. 2014.

SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; MENEZES, C. R.; FRIES, L. M.; MENEZES, M. F. C.; STEFANELLO, F. S. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **Revista Eletronica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, p. 66-75, maio 2014.

SHIBAO, J.; BASTOS, D. H. M. Produtos da reação de Maillard em alimentos: implicações para a saúde. **Revista de Nutrição**, v. 24, n. 6, p. 895-904, dez. 2011.

SOARES, T. G. Papel de galactanas sulfatadas na inflamação e migração celular mediada por lectinas. 54 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, **Universidade Federal do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, 2016.

STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular Aspects Of Medicine**, v. 24, n. 6, p. 345-351, dez. 2003.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville, v. 7, n.2, p. 12-20, dez. 2006.

SUN, Y.; ZHANG, N.; ZHOU, J.; DONG, S.; ZHANG, X.; GUO, L.; GUO, G. Distribution, Contents, and Types of Mycosporine-Like Amino Acids (MAAs) in Marine Macroalgae and a Database for MAAs Based on These Characteristics. **Marine Drugs**, v. 18, n. 1, p. 43, 7 jan. 2020.

TALA, F.; CHOW, F. Ecophysiological characteristics of *Porphyra* spp. (Bangiophyceae, Rhodophyta): seasonal and latitudinal variations in northern-central chile. **Journal Of Applied Phycology**, v. 26, n. 5, p. 2159-2171, 12 fev. 2014.

TAMURA, Y.; TAKENAKA, S.; SUGIYAMA, S.; NAKAYAMA, R. Occurrence of Anserine as an Antioxidative Dipeptide in a Red Alga, *Porphyra yezoensis*. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, v. 62, n. 3, p. 561-563, jan. 1998.

TROUBA, K. J.; HAMADEH, H. K.; AMIN, R. P.; GERMOLEC, D. R. Oxidative Stress and Its Role in Skin Disease. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 4, n. 4, p. 665-673, 2002.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**, Campinas, v. 30, n. 3, p. 616-622, jun. 2007.

URREA-VICTORIA, V.; PIRES, J.; TORRES, P. B.; CHOW, Fungyi; SANTOS, Déborah. Ensaio antioxidante em microplaca do poder de redução do ferro (FRAP) para extratos de algas. DOI: 10.13140/RG.2.2.24094.64322. 2016.

URREA-VICTORIA, V.; FURLAN, C. M.; SANTOS, D. Y. A. C.; CHOW, F. Antioxidant potential of two Brazilian seaweeds in response to temperature: *Pyropia spiralis* (red alga) and *Sargassum stenophyllum* (brown alga). **Journal Of Experimental Marine Biology And Ecology**, v. 549, n. 1, p. 151706, abr. 2022.

VASCONCELOS, A. G.; ARAÚJO, K. V.; SANTANA, L. A. B. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: uma revisão. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde**, Piauí, v. 5, n. 3, p. 27-51, 6 set. 2015.

VINSON, J. A.; HOWARD, T. B. Inhibition of protein glycation and advanced glycation end products by ascorbic acid and other vitamins and nutrients. **Nutritional Biochemistry**, v. 7, p. 659-663, 1996.

WATANABE, F.; YABUTA, Y.; BITO, T.; TENG, F. Vitamin B12- containing plant food sources for vegetarians. **Nutrients**, v. 6, p. 1861– 1873, 2014.

WIJETUNGE, D. C. R.; PERERA, H. K. I. A novel in vitro method to identify protein glycation inhibitors. **Asian Journal Medicine Science**, v. 5, n. 3, p. 15–21, 2014.

YU, X.; ZHOU, C.; YANG, H.; HUANG, X.; MA, H.; QIN, X.; HU, J. Effect of ultrasonic treatment on the degradation and inhibition cancer cell lines of polysaccharides from *Porphyra yezoensis*. **Carbohydrate Polymer**, v. 117, p. 650–656, 2015.

ZHANG, Q.; LI, N.; ZHOU, G.; LU, X.; XU, Z.; LI, Z. In vivo antioxidant activity of polysaccharide fraction from *Porphyra haitanensis* (Rhodophyta) in aging mice. **Pharmacological Research**, v. 48, p.151–155, 2003.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v.64, p.555-559, 1999.