U.PORTO

MESTRADO

TOXICOLOGIA E CONTAMINAÇÃO AMBIENTAIS

Evaluation of microalgae for their potential beneficial effects on human metabolic diseases

Rita Santos Teixeira

M

2021

U.PORTO

Rita. Santos Teixeira. Evaluation of microalgae for their potential beneficial effects on human metabolic diseases.

Evaluation of microalgae for their potential beneficial effects on human metabolic diseases.
Rita Santos Teixeira

M.ICBAS **2021**

SEDE ADMINISTRATIVA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
FACULDADE DE CIÊNCIAS

Rita Santos Teixeira

Evaluation of microalgae for their potential beneficial effects on human metabolic diseases

Dissertação de Candidatura ao grau de Mestre em Toxicologia e Contaminação Ambientais submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador – Doutor Ralph Urbatzka

Categoria – Investigador pós-doutorado

Afiliação – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR).

Co-orientador – Professor Víctor Vasconcelos

Categoria – Professor catedrático

Afiliação – Faculdade de Ciências da Universidade do Porto

Categoria – Diretor

Afiliação – Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR).

Agradecimentos

Este trabalho não teria sido possível sem o esforço e apoio de várias pessoas e instituições, a quem gostaria de referir e agradecer. Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. Ralph Urbatzka, por todas as oportunidades de aprendizagem e pela orientação que me permitiu concluir a minha dissertação. Em segundo lugar, ao meu co-orientador, Professor Víctor Vasconcelos, pela oportunidade de realizar o meu trabalho de dissertação no CIIMAR. A todas as pessoas do BBE por me acolherem no laboratório, pela simpatia e pela ajuda, nomeadamente, ao Tiago e à Dr. Ana Regueiras. E à Rita, minha parceira de laboratório, por todo o companheirismo, ajuda e força transmitida. Ao projeto AlgaValor (POCI-01-0247-FEDER-035234), financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do COMPETE2020-Programa Operacional para a Competitividade e Internacionalização (POCI) e PORTUGAL2020, e fundos nacionais através da FCT UIDB / 004423/2020 e UIDP / 04423/2020. A todas as minhas amigas, pela motivação e por terem acreditado em mim desde o primeiro dia, um agradecimento especial à Ângela e à Teresa. Aos meus pais, Paula e Jorge, por todo o apoio incondicional, pela força e por possibilitarem todo o meu percurso académico.

Resumo

A obesidade, acumulação de gordura no corpo, considerada uma desordem metabólica complexa, relaciona-se com o aparecimento de outros distúrbios metabólicos. Vários produtos naturais (extratos brutos e compostos puros isolados) têm sido explorados para combater a obesidade, com vista a associar menos efeitos adversos a esta prática. As microalgas são uma potencial fonte de produtos de alto valor e novas moléculas que podem ser interessantes para a exploração biotecnológica e farmacêutica, com o desenvolvimento de novos produtos com aplicação na saúde humana, nomeadamente doenças metabólicas. Este trabalho teve como objetivo avaliar diversos extratos da microalga *Chlorococcum* sp. quanto às suas atividades anti-esteatose *in vitro* com a linha de células de carcinoma de hepatócitos humanos HepG2, anti-inflamatória *in vitro* com a linha de células de macrófagos de ratinhos RAW264.7, anti-obesidade e anti-diabetes *in vivo* em larvas de peixe-zebra. A biomassa da microalga *Chlorococcum* sp. foi extraída por processamento de alta pressão (HPP), com diferentes solventes (água, acetona, etanol 96% e etanol 48%) e intensidades de pressão, e por tratamento óhmico, com diferentes combinações de frequência de campo elétrico e tempos de tratamento distintas. Além disso, o mecanismo de ação molecular das amostras ativas foi estudado através da técnica Western Blot, utilizando alguns alvos importantes na regulação do metabolismo lipídico e adipogénese (CEBPα, ACACα, PRKA-β1, PPAR γ, ACACα Phospho-Ser80 e PRKA-β1 Phospho-Ser181). Por fim, o perfil metabólico das amostras bioativas foi avaliado por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS), com o intuito de identificar possíveis compostos, conhecidos ou putativos, que são responsáveis pelas bioatividades observadas. Os resultados mostraram que alguns extratos da microalga *Chlorococcum* sp., com maior destaque para as amostras extraídas por HPP, apresentaram potencial anti-esteatose, anti-inflamatório, anti-obesidade e anti-diabetes. As condições de extração demonstraram ter influência nos resultados das diferentes atividades realizadas. Desta forma, os resultados indicam que alguns extratos de *Chlorococcum* sp. podem representar um recurso interessante para o desenvolvimento de produtos com aplicação na saúde humana, concretamente em doenças metabólicas.

Abstract

Obesity, the accumulation of fat in the body, is considered a complex metabolic disorder, and related to the appearance of other metabolic disorders. Several natural products (raw extracts and common pure compounds) have been explored to combat obesity, with a view to associating fewer adverse effects with this practice. Microalgae are a potential source of high-value products and new molecules that can be interesting for biotechnological and pharmaceutical exploration, with the development of new products with application in human health. This work aimed to evaluate several extracts of the microalgae *Chlorococcum* sp. For metabolic diseases, namely, *in vitro* anti-steatosis activities with the human hepatocyte carcinoma cell line HepG2, *in vitro* anti-inflammatory activities with the mouse macrophage cell line RAW264.7, and anti-obesity and anti-diabetes activities *in vivo* in zebrafish larvae. The biomass of the microalgae *Chlorococcum* sp. was extracted by high pressure processing (HPP), with different solvents (water, acetone, ethanol 96% and ethanol 48%) and pressure intensities, and by ohmic treatment, with different electric field frequency units and different treatment times. Furthermore, the molecular mechanism of action of the most promising extracts for steatosis was studied using the Western Blot technique, using some important targets in the regulation of lipid and adipogenic metabolism (CEBPα, ACACα, PRKA-β1, PPAR γ, ACACα Phospho-Ser80 and PRKA-β1 Phospho-Ser181). Finally, the metabolic profile of the promising extracts was evaluated by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS / MS), in order to identify possible, known or putative, that are responsible for the observed bioactivities. The results demonstrated that some extracts of the microalgae *Chlorococcum* sp., had anti-steatosis, anti-inflammatory, anti-obesity and anti-diabetes potential. The extraction conditions showed to have an influence on the results of the bioactivities and more interesting results were obtained by extractions with HPP. In summary, some extracts of *Chlorococcum* sp. may represent an interesting resource for the development of products with application in human health, specifically in metabolic diseases.

Índice

Lista de figuras vii

Lista de tabelas xi

Lista de abreviaturas xii

1. Introdução 1

1.1. Obesidade e síndrome metabólica 1

1.2. Esteatose hepática 3

1.3. Diabetes *mellitus* tipo 2 3

1.4. Inflamação 5

1.5. Compostos naturais 5

1.6. Microalgas 6

1.6.1. Aplicações das microalgas 6

1.6.2. *Chlorococcum* sp. 7

1.7. Peixe-zebra (*Danio rerio*) 8

1.7.1. Peixe-zebra como modelo de estudo de síndrome metabólica 9

1.8. Objetivos da investigação 10

2. Materiais e Métodos 11

2.1. Extratos da microalga *Chlorococcum* sp. 11

2.1.1. Preparação de amostras 13

2.2. Ensaios *in vitro* 13

2.2.1. Ensaio anti-esteatose na linha celular HepG2 13

2.2.2. Ensaio anti-inflamação na linha celular RAW264.7 15

2.3. Ensaios *in vivo* 16

2.3.1. Manutenção e preparação das larvas de peixe-zebra 16

2.3.2. *Screening* de extratos da microalga *Chlorococcum* sp. com potencial atividade anti-obesidade em larvas de peixe-zebra 17

2.3.3. Screening de extratos da microalga *Chlorococcum* sp. com potencial atividade anti-diabetes em larvas de peixe-zebra 17

2.3.4. Análise e quantificação de imagens 18
2.4. Western Blot 19
2.4.1. Preparação de amostras 19
2.4.2. Extração de proteína 19
2.4.3. Medição da concentração de proteína (Método Bradford) 19
2.4.4. Gel de eletroforese e Assemble iBlot TM 2 Transfer 20
2.4.5. Coloração com Ponceau e *blocking* 20
2.4.6. Anticorpo primário e secundário 21
2.4.7. Revelação da membrana e *stripping* 22
2.5. Perfil metabólico 22
2.5.1. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) 22
2.5.2. Molecular *networking* e análise metabolómica 23
2.6. Análise estatística 24
3. Resultados 25
3.1. Ensaio anti-esteatose na linha celular HepG2 25
3.1.1. Amostras Universidade de Aveiro 25
3.1.2. Amostras Universidade do Minho 30
3.2. Ensaio anti-inflamação na linha celular RAW264.7 32
3.2.1. Amostras Universidade de Aveiro 32
3.2.2. Amostras Universidade do Minho 36
3.3. Screening de extratos da microalga *Chlorococcum* sp. com potencial atividade anti-obesidade em larvas de peixe-zebra 39
3.3.1. Amostras Universidade de Aveiro 39
3.3.2. Amostras Universidade do Minho 41
3.4. Screening de extratos da microalga *Chlorococcum* sp. com potencial atividade anti-diabetes em larvas de peixe-zebra 43
3.4.1. Amostras Universidade de Aveiro 43
3.4.2. Amostras Universidade do Minho 46
3.5. Western Blot 47

3.6. Perfil metabólico 49
3.6.1. Molecular *networking* e análise metabolómica 49
4. Discussão 52
5. Conclusão 60
6. Referências 61

Lista de figuras

Figura 1 - Mecanismos fisiopatológicos relacionados com o desenvolvimento de síndrome metabólica. Adaptado de Rochlani et al., 2017. 1
Figura 2 - Relação entre o desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2 e a disfunção das células β do pâncreas. Adaptado de S. E. Kahn et al., 2006. 4
Figura 3 - Morfologia da microalga *Chlorococcum* sp.. Retirado de Saha & Murray, 2018. 8
Figura 4 - Amostras extraídas por HPP com uma concentração de 10 mg/mL. 13
Figura 5 - Amostras extraídas por tratamento convencional e óhmico com uma concentração de 10 mg/mL. 23
Figura 6 - Atividade anti-esteatose de extratos da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos por alta pressão hidrostática. a) metodologia *point fluorescence* na concentração final 10 µg/mL; b) metodologia *point fluorescence* na concentração final 25 µg/mL; c) metodologia *area scan* na concentração final 10 µg/mL; d) metodologia *area scan* na concentração final 25 µg/mL; e) metodologia *imaging* na concentração final 10 µg/mL; f) metodologia *imaging* na concentração final 25 µg/mL. Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + SO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.... 26
Figura 7 - Células HepG2 *fat-overloaded* visualizadas no microscópio de fluorescência. 27
Figura 8 - Atividade anti-esteatose de extratos da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos por alta pressão hidrostática, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + SO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$..... 28
Figura 9 - Células HepG2 visualizadas no microscópio de fluorescência. a) células tratadas com a amostra CL10; b) células tratadas com a amostra CL22; c) células pertencentes ao controlo negativo; d) células *fat-overloaded*..... 29
Figura 10 - Ensaio SRB para deteção da viabilidade celular da linha celular HepG2, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, com três réplicas para cada amostra (n total = 6). Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + SO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$. 30
Figura 11 - Atividade anti-esteatose de extratos da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos por tratamento convencional e óhmico, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Ensaio SRB para deteção da viabilidade celular da linha

celular HepG2, c) concentração final de 10 µg/mL e d) concentração final de 25 µg/mL. Dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, com três réplicas para cada amostra (n total = 6). Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + SO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001. 31
Figura 12 - Atividade anti-inflamatória de extratos da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos por alta pressão hidrostática, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + LPS (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001. 33
Figura 13 - Atividade pro-inflamatória de extratos da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos por alta pressão hidrostática, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente (DMSO). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001. 34
Figura 14 - Ensaio MTT para deteção da viabilidade celular dos macrófagos RAW264.7, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, com quatro réplicas para cada amostra (n total = 8). Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + LPS (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001. 35
Figura 15 - Atividade anti-inflamatória de extratos da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos por tratamento convencional e óhmico, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Atividade pro-inflamatória de extratos da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos por tratamento convencional e óhmico, c) concentração final de 10 µg/mL e d) concentração final de 25 µg/mL. Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + LPS (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001. 37
Figura 16 - Ensaio MTT para deteção da viabilidade celular dos macrófagos RAW264.7, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, com quatro réplicas para cada amostra (n total = 8). Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + LPS (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001. 38
Figura 17 - Atividade de redução lipídica de extratos da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos por alta pressão hidrostática, em larvas de peixe-zebra. Os dados foram

normalizados em relação ao controlo DMSO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001. 40
Figura 18 - Representação das imagens correspondestes ao extrato CL8 (parte superior) e ao controlo DMSO (parte inferior). Imagens obtidas no microscópio de flurescência (lado esquerdo), retiradas do terceiro ensaio independente. 41
Figura 19 - Atividade de redução lipídica de extratos da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos por tratamento convencional e óhmico, em larvas de peixe-zebra. Os dados foram normalizados em relação ao controlo DMSO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001. 42
Figura 20 - Representação das imagens correspondestes ao extrato D121 (parte superior) e ao controlo DMSO (parte inferior). Imagens obtidas no microscópio de flurescência (lado esquerdo), retiradas do segundo ensaio independente. 42
Figura 21 - Atividade anti-diabetes de extratos da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos por alta pressão hidrostática, no saco vitelino de larvas de peixe-zebra. Os dados foram normalizados em relação ao controlo DMSO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001. 44
Figura 22 - Representação das imagens correspondestes ao controlo DMSO (parte superior) e ao controlo EMODIN (parte inferior). Imagens obtidas no microscópio de flurescência (lado esquerdo), retiradas do terceiro ensaio independente. 44
Figura 23 - Atividade anti-diabetes de extratos da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos por alta pressão hidrostática, no olho de larvas de peixe-zebra. Os dados foram normalizados em relação ao controlo DMSO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001. 45
Figura 24 - Atividade anti-diabetes de extratos da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos por tratamento convencional e óhmico, no olho (a) e saco vitelino (b) de larvas de peixe-zebra. Os dados foram normalizados em relação ao controlo DMSO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001. 46
Figura 25 - Expressão de CEBPα (a), PPAR γ (b), ACACα (c), ACACα fosforilado (d), rácio entre ACACα fosforilado e ACACα (e), PRKA-β1 (f), PRKA-β1 fosforilado (g) e rácio entre PRKA-β1 fosforilado e PRKA-β1 (h) em células HepG2. Um ensaio foi realizado para a concentração final de 25 µg/mL, com três réplicas para cada amostra (n total = 3). Os dados foram normalizados em relação ao controlo DMSO. Os resultados

estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001..... 48
Figura 26 - Comparação da expressão das bandas de proteína entre o anticorpo CEBPα (A) e β-actina (B). 49
Figura 27 - Identificação dos principais clusters obtidos a partir do molecular *networking* de extratos HPP extraídos com o solvente acetona, Universidade de Aveiro, visualizado no Cytoscape. O molecular *networking* não se encontra completo, apenas clusters e grupos superiores a três *nodes* estão representados. 50

Lista de tabelas

Tabela 1 - Condições de extração por HPP selecionadas para o estudo da microalga *Chlorococcum* sp.. 12
Tabela 2 - Condições de extração por tratamento convencional e óhmico selecionadas para o estudo da microalga *Chlorococcum* sp.. 12
Tabela 3 - Resumo dos anticorpos primários e secundários utilizados durante o estudo. 21
Tabela 4 - Identificação dos 41 picos de massa bioativos através das plataformas *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) e *Dictionary of Natural Products* (DNP), correspondendo a diversos compostos. As identificações no GNPS são baseadas na fragmentação MS2, já o critério de pesquisa no DNP baseou-se no precursor mass do valor de m/z com uma variação de +/- 0.002. As identificações aceites basearam-se num ppm < 5. 51

Lista de abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
BOGA	Biotério de Organismos Aquáticos
BSA	Albumina Sérica Bovina
CIIMAR	Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNP	Dictionary of Natural Products
DPF	Dia Pós Fertilização
ESI	Ionização Electrospray
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
GLUTs	Marcadores de glucose
GNPS	Global Natural Products Social Molecular Networking
FBS	Soro Bovino Fetal
FIMT	Fragment Ion Mass Tolerance
HBSS	Hank’s Buffered Salt Solution
HMGB1	Grupo de proteínas alta mobilidade 1
HPP	High Prresure Processing
Hz	Hertz
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corporal
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP-1	Proteína quimioatrativa de monócitos 1
MeOH	Metanol
MS-222	Tricaína
NPA	Natural Products Atlas
NR	Nile Red
PBST	Phosphate Buffered Saline with Tween
Pen-Strep	Penicilina-Estreptomicina
PIMT	Precursor Ion Mass Tolerance
PPAR γ	Recetor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma
PPM	Partes por milhão
PTU	Feniltioureia

RAGE	Recetor para produtos finais de glicação avançada
REV	Resveratrol
RPM	Rotações por minuto
SO	Oleato de Sódio
SRB	Sulforhodamina B
TCA	Ácido Tricloroacético
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa

1. Introdução

1.1. Obesidade e síndrome metabólica

No que se refere à síndrome metabólica, a mesma caracteriza-se pelo conjunto de anormalidades metabólicas, com destaque para a hipertensão, obesidade, resistência à insulina e dislipidemia. Por outro lado, existe também uma forte correlação para o desenvolvimento de doença cardiovascular aterosclerótica (espessamento e perda da elasticidade da parede arterial) (Rochlani et al., 2017). Estas corelações encontram-se representadas na Figura 1.

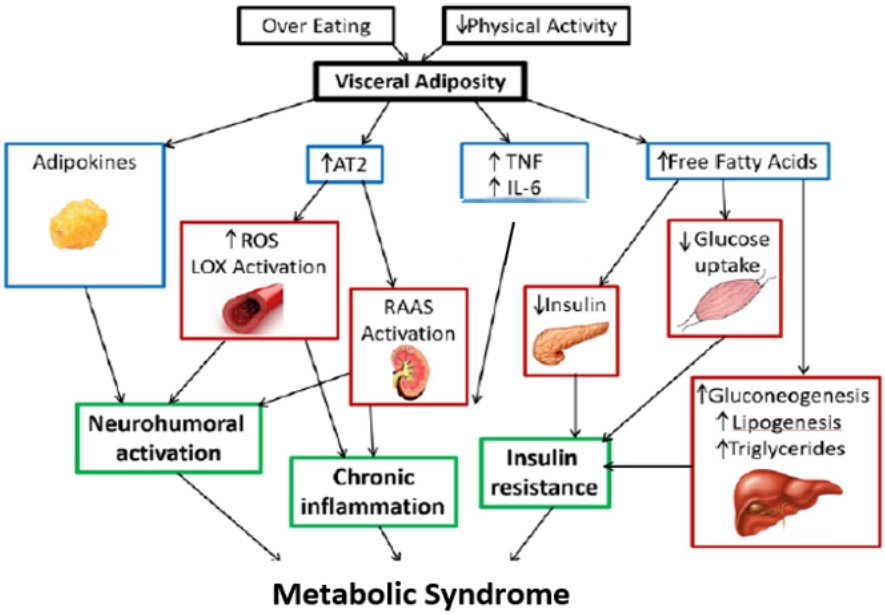

Figura 1 - Mecanismos fisiopatológicos relacionados com o desenvolvimento de síndrome metabólica. Adaptado de Rochlani et al., 2017.

A obesidade é, assim, uma desordem metabólica complexa, com a interação entre vários tecidos, e caracterizada pela regulação do metabolismo de lípidos e glicose (Rochlani et al., 2017). Relacionada com o aparecimento de outros distúrbios metabólicos, tais como hepatosteatose (*fatty liver disease*), diabetes *mellitus* tipo 2, aterosclerose (acúmulo de placas de gordura, cálcio e outras substâncias nas artérias), dislipidemia (aumento de colesterol e triglicerídeos no plasma), doenças renais, cardiovasculares e vários tipos de cancro (Nakayama et al., 2020, 2018).

Esta doença é caracterizada pelo aumento do tecido adiposo visceral, associada a adultos e crianças em todo o mundo, em prevalência nos países desenvolvidos e a evoluir nos países em desenvolvimento, denomina-se por isso uma epidemia global (Nakayama et al., 2020, 2018). Definida por um índice de massa corporal (IMC) ≥ 30 kg/m^2 (Krentz, Fujioka, & Hompesch, 2016).

Em relação aos fatores de risco relatados, estilo de vida sedentário, aumento de idade, balanço de energia positivo e baixo nível socioeconómico, podem ser associadas várias outras causas, entre as quais ambientais, comportamentais e genéticas (Pi-Sunyer, 2002).

A nível celular, o aumento do tecido adiposo visceral, ou seja, o acumular de gordura, ocorre sobretudo nos adipócitos, levando ao aumento no seu tamanho (hipertrofia dos adipócitos) e número (hiperplasia dos adipócitos) (Urbatzka et al., 2018).

As dietas alimentares hipocalóricas e exercício físico apesar de serem umas das respostas para o combate desta doença, as suas taxas de sucesso são inferiores a 25% (Nakayama et al., 2020). Estas medidas devem ser implementadas com maior foco na prevenção e no controlo da obesidade. Por outro lado, a cirurgia bariátrica, no caso de obesidade mórbida (IMC ≥ 40 kg/m^2), embora eficaz, está associada à possibilidade de reganho de peso (Krentz et al., 2016).

Assim, medicamentos anti-obesidade são usados para o tratamento de doentes com casos de obesidade mais expressivos, associados também a outras comorbidades, com o objetivo de reduzir o apetite e inibir a absorção de gordura (Nakayama et al., 2018). Embora esta abordagem mostre mais eficácia, ocorrem vários casos de medicamentos retirados do mercado farmacêutico devido aos seus efeitos adversos. Tal como o medicamento rimonabanto (aprovado pela Agência Europeia de Medicamentos), antagonista do recetor CB1 reduzindo a ingestão de alimentos, referenciado por risco elevado de doenças psiquiátricas (Nakayama et al., 2020), ansiedade, depressão e suicídio (Krentz et al., 2016). Para além disso, diferentes efeitos foram também verificados com o uso de outros medicamentos como por exemplo hipertensão, insônia e dependência (Nakayama et al., 2018).

Com vista a criar outras abordagens, produtos naturais (extratos brutos e compostos puros isolados) têm sido explorados para combater a obesidade, com vista a associar menos efeitos adversos a esta prática (Mohamed et al., 2014; Nakayama et al., 2020).

1.2. Esteatose hepática

A doença hepática gordurosa não alcoólica, fígado gordo, é uma doença hepática crónica, com uma incidência mundial de 14% a 32% (Ma et al., 2019), comum em pacientes diagnosticados com obesidade e diabetes tipo 2 (Inoue et al., 2005). Tendo sido encontradas evidências entre a resistência à insulina e fígado gordo, levando ao acúmulo de ácidos gordos em excesso no fígado. Esta associação pode ser caracterizada com casos de esteatose hepática simples, acúmulo em excesso de lípidos no fígado, e esteatose hepática fatal, ocorrendo uma grande degradação do fígado (Lin et al., 2010), como cirrose, insuficiência hepática e carcinoma hepatocelular (Bagherniya et al., 2018). Mudanças no estilo de vida, como dieta alimentar, atividade física e perca de peso, representam a primeira recomendação para o tratamento e prevenção desta doença, mas as mesmas não se mostram eficazes. Sendo a doença hepática gordurosa não alcoólica uma doença complexa que envolve vários órgãos e tecidos, é recomendado a combinação de vários agentes terapêuticos. No entanto, terapias médicas convencionais demostram-se pouco eficazes e, uma vez mais, potenciadores de efeitos adversos. É assim essencial a identificação de novas terapias complementares, constituídas por compostos naturais bioativos, para a prevenção e tratamento desta doença (Bagherniya et al., 2018).

1.3. Diabetes *mellitus* tipo 2

Diabetes *mellitus*, doença metabólica mais comum em todo o mundo, encontra-se na origem de diversos casos como cegueira, insuficiência renal e amputações de membros inferiores em adultos, podendo também influenciar o aparecimento de doenças cardiovasculares e acidentes vasculares cerebrais. O predomínio da doença resulta na junção de fatores do tipo dieta alimentar, atividade física e idade, com predisposição genética (B. B. Kahn, 1998).

Diabetes tipo 1 baseia-se na destruição autoimune das células β do pâncreas, causando défice de insulina. Por outro lado, diabetes tipo 2, representando cerca de 90% dos casos, é caracterizada pelas seguintes hipóteses, secreção desregulada de insulina, resistência à ação da insulina na captação de glicose em tecidos periféricos (músculos esqueléticos e adipócitos (Goldstein, 2002)) e, por fim, inibição da insulina à produção hepática de glicose (B. B. Kahn, 1998).

É de salientar a associação de risco de desenvolvimento de diabetes tipo 2 e hiperglicemia (Goldstein et al., 2002), conforme ilustrado na Figura 2, quando a resistência à insulina é seguida de disfunção de células β pancreáticas, cuja função consiste na libertação de insulina, incapazes de compensar a diminuição da sensibilidade à insulina (S. E. Kahn et al., 2006).

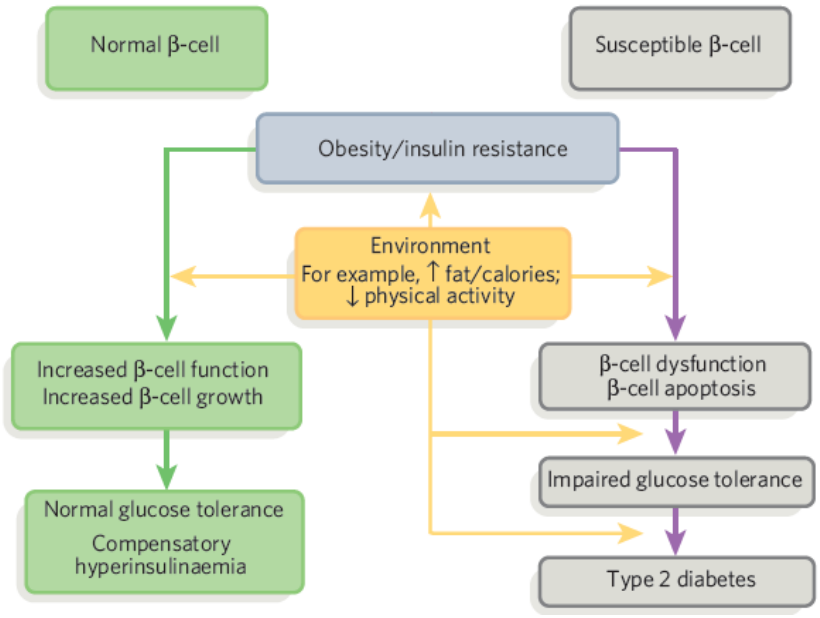

Figura 2 - Relação entre o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2 e a disfunção das células β do pâncreas. Adaptado de S. E. Kahn et al., 2006.

Como visto anteriormente, a obesidade está diretamente ligada a uma maior probabilidade de desenvolvimento de resistência à insulina e diabetes tipo 2. Devido à libertação, por parte do tecido adiposo visceral, de quantidades aumentadas de ácidos gordos não esterificados, glicerol, hormonas e citocinas pró-inflamatórias. Ácidos gordos não esterificados possuem a capacidade de bloquear as vias de sinalização da insulina, induzindo a sua resistência, bem como danificar a função das células β pancreáticas (S. E. Kahn et al., 2006).

1.4. Inflamação

A obesidade, através da expansão do tecido adiposo visceral e consequente disfunção metabólica dos adipócitos (hipertrofia e hipoxia local) e o aumento da resistência à insulina, é uma das causas primordiais que conduzem à inflamação do tecido adiposo, com a síntese e expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 e IL-6) e quimiocinas (A. Engin, 2017; Liu & Nikolajczyk, 2019). A morte dos adipócitos implica uma inflamação crônica de baixo grau por macrófagos ativados, infiltrados no tecido adiposo, estimulando a produção de citocinas, que por sua vez contribuem para o desenvolvimento de resistência à insulina. As citocinas mais possíveis de serem libertadas por células inflamatórias que infiltram o tecido adiposo são o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), interleucina 6 (IL-6), proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1) e IL-1 (Stienstra et al., 2011). TNF-α causa fosforilação e inativação dos recetores de insulina no tecido adiposo, bem como nas células musculares lisas, aumentando a indução da lipólise e inibindo a liberação de adiponectina (hormona proteica envolvida na regulação dos níveis de e degradação de ácidos gordos) (Rochlani et al., 2017).

A resposta imune, aquando da necrose celular, é desencadeada por um grupo de proteínas citosólicas e nucleares específicas. Por exemplo, o grupo de proteínas alta mobilidade 1 (HMGB1) desencadeia a expressão de citocinas pró-inflamatórias em tecido adiposo e fatores de adesão em macrófagos por meio da ativação do recetor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) (A. Engin, 2017).

1.5. Compostos naturais

Organismos terrestres e aquáticos representam uma fonte de compostos bioativos com possíveis aplicações na saúde humana. Produtos naturais derivados de diversas origens como animais, plantas, algas, bactérias e fungos, constituem uma vasta diversidade estrutural e química (Castro et al., 2016). Através de otimizações integram e representam uma grande parte da fração ativa dos medicamentos, para doenças como cancro e infeções (Harvey, 2008). Em comparação aos tratamentos químicos, combinações de produtos naturais podem afirmar-se como uma vantagem, dado ao aumento da atividade sinérgica, aumentando, assim, a biodisponibilidade e ação em múltiplos alvos moleculares, com formação de novos agentes terapêuticos e farmacológicos.

Relativamente às diversas espécies de plantas e animais de todo o mundo, o oceano representa cerca de 80%. Assim, o ambiente marinho, com uma vasta biodiversidade, integra uma fonte promissora de produtos naturais, com potencial para o tratamento de doenças humanas (Malve, 2016). Com o surgimento de novas doenças e

com o interesse em combater as já existentes, substâncias bioativas presentes em produtos naturais marinhos representam um recurso alternativo para a criação de novos medicamentos, para doenças como o cancro e inflamação (Lu et al., 2021).

1.6. Microalgas

As algas podem ser divididas em dois grandes grupos: Macroalgas e Microalgas. As microalgas são produtores primários (Ghosh et al., 2015), microrganismos fotossintéticos unicelulares (capazes de converter energia solar em energia química por meio da fotossíntese), com uma taxa de crescimento elevada, necessitando apenas de luz solar e reduzidas quantidades de nutrientes (Saha & Murray, 2018). Estes produtores primários caracterizam-se pela capacidade de produzir grandes quantidades de lípidos, especialmente em condições de crescimento desfavoráveis, chegando a acumular entre 30% a 60% em relação ao seu peso seco (Harwati, Willke, & Vorlop, 2012). Nomeadamente, os ácidos gordos, estruturalmente diversos, manifestam grande potencial para aplicação em indústrias alimentares e biocombustíveis (Sahu et al., 2013). Para além disso, a biomassa das microalgas pode conter uma percentagem alta de hidratos de carbono (até 60%) e proteínas (até 60%) (Saha & Murray, 2018).

As algas verdes (*Chlorophyta*) constituem grupos de algas morfologicamente diversos, descritas com diversas formas unicelulares, coloniais, filamentosas e pseudoparenquimatosas. Uma das mais amplamente distribuídas, dependendo da espécie em questão, enquadram-se não só em ambientes aquáticos, marinhos e de água doce, mas também terrestres. Em habitats terrestres as mais encontradas são as cocóides, como a *Chlorococcum* sp. (Metting, 1996).

1.6.1. Aplicações das microalgas

Consideradas um dos produtos naturais mais promissores e com potencial, as microalgas são uma fonte sustentável de vários compostos com atividades biológicas, com inúmeros benefícios com aplicabilidade em diferentes áreas, tais como, saúde, nomeadamente no sector farmacêutico, alimentar, biotecnológico (Metting, 1996) e biocombustíveis (Saha & Murray, 2018). Em particular na área da saúde, atividades biológicas antioxidante, anti-inflamatório, anti-diabetes e atividades inibidoras de fibrose hepática, a título exemplificativo, foram detetadas através do uso da biomassa das microalgas (Saha & Murray, 2018), possibilitando assim a identificação de novos compostos para o desenvolvimento farmacêutico. No que diz respeito à indústria alimentar humana, destaca-se a criação de suplementos alimentares e a representação de uma fonte de corantes alimentares naturais (Spolaore et al., 2006).

O reconhecimento e interesse nas microalgas nas diversas áreas é fundamentado com base na constituição da biomassa, visto que esta é constituída por minerais, vitaminas, ácidos gordos (incluindo ómega-3 e ómega-6), polissacarídeos (Metting, 1996), proteínas e pigmentos, como carotenóides (β-caroteno e astaxantina) (Ghosh et al., 2015; Spolaore et al., 2006). Carotenóides apresentam propriedades antioxidantes, podem ser utilizados como intensificadores de cor e aromatizantes (Metting, 1996), mas também atuam na prevenção da obesidade (Nakayama et al., 2018).

Tendo como exemplo, o caso da fucoxantina, um carotenóide da alga marinha marrom (*Fucus vesiculosus*) capaz de atuar ao nível da modulação dos níveis de glicose e insulina no sangue e suprimir o ganho de peso em ratinhos. Sendo isto possível devido ao fucoxantinol, metabólito produzido pela fucoxantina, capaz de diminuir a regulação do recetor gama ativado pelo proliferador de peroxissoma (PPAR γ), também conhecido por recetor de resistência à insulina reversa da glitazona, e suprimir a diferenciação de adipócitos. Para além disso, alginatos produzidos também por algas marinhas marron demostram efeitos anti-obesidade, visto que detêm a capacidade de aumentar a saciedade, auxiliando na redução de peso (Nakayama et al., 2018).

Por outro lado, as microalgas, especialmente as microalgas verdes, podem desempenhar um papel importante no tratamento de efluentes poluídos (Metting, 1996).

1.6.2. *Chlorococcum* sp.

Chlorococcum sp. é uma microalga verde (Lv et al., 2017), pertencente à grupo das Clorofíceas (*Chlorophyceae*) unicelulares (Saha & Murray, 2018). Esta microalga têm uma ampla distribuição mundial, na qual se incluí habitats aquáticos, de água doce e marinhos (Saha & Murray, 2018), e terrestres (Cáceres, Megharaj, & Naidu, 2008). Com elevada relevância no que se refere à conservação do equilíbrio ecológico em ambos os ambientes, aquáticos e terrestres (Cáceres et al., 2008). Demonstrando uma capacidade em prevalecer em ambientes de pH extremos e altas temperaturas (Yuan et al., 2002). Possui outras propriedades entre as quais, capacidade autofloculante (Lv et al., 2017) e degradação de poluentes em águas residuais com altas concentrações de nitrogénio (Lv et al., 2018).

Apresenta um crescimento rápido, com células esféricas ou mais alongadas, de diversos tamanhos, que podem formar aglomerados irregulares, Figura 3 (Saha & Murray, 2018; Shiels et al., 2021). As células desta microalga demostram capacidade de produção de carotenóides, particularmente astaxantina, adonixantina, cantaxantina e β-caroteno, apresentando este último propriedades antioxidantes (Ghosh et al., 2015). Astaxantina é um carotenóide de alto valor, devido à sua cor vermelha e uma elevada

capacidade antioxidante e neutralização de radicais livres (Rajesh et al., 2017), podendo ser usada como corante alimentar e na área medicinal (Yuan et al., 2002). Por outro lado, a biomassa de *Chlorococcum* sp. demonstrou presença de compostos fenólicos, alcaloides, polissacarídeos e ácidos gordos (Olasehinde, Olaniran, & Okoh, 2021). Por último, potencial de acumulação e armazenamento de lipídios no interior da célula foram também constatados (Mahapatra & Ramachandra, 2013).

No que diz respeito à aplicação em biocombustíveis, conforme relatado por (Saha & Murray, 2018), esta microalga pode ser explorada para a produção de biodiesel.

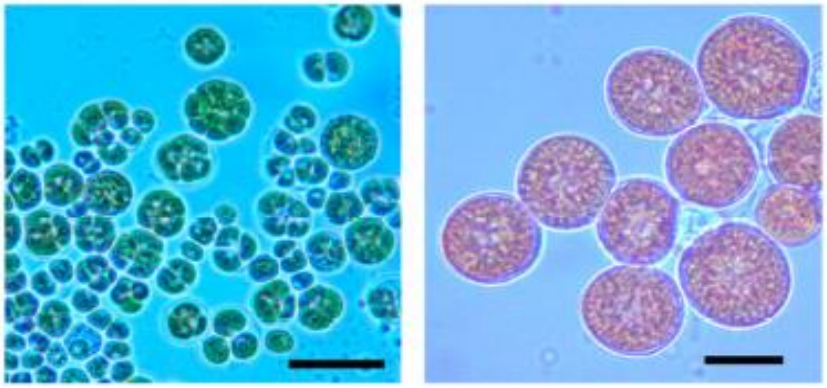

Figura 3 - Morfologia da microalga Chlorococcum sp.. Retirado de Saha & Murray, 2018.

1.7. Peixe-zebra (*Danio rerio*)

Danio rerio, conhecido também por peixe-zebra, representa um modelo experimental animal ideal em vários campos de estudos biológicos, oferecendo diversas vantagens. Relativamente as suas vantagens para uso como modelo experimental destaca-se: o reduzido tamanho da espécie, o que implica baixos custos de manutenção da mesma, uma elevada taxa de fertilização, ocorrendo esta a nível externo, desenvolvimento embrionário bem descrito visualmente, bem como a transparência dos ovos gerados após fertilização e um ciclo de geração rápido (Benchoula et al., 2019; Zang, Maddison, & Chen, 2018). Isto é, um embrião de peixe-zebra pode atingir o desenvolvimento larval completo no 3 dia pós a fertilização (DPF), *free swiming* larvae, e alcançar a fase adulta 3 meses depois da fertilização. Por último, os embriões desta espécie podem ser geneticamente modificados (Benchoula et al., 2019).

Parte das características mencionadas anteriormente, como o reduzido tamanho da espécie, o desenvolvimento embrionário bem descrito visualmente e um ciclo de geração rápido, permitem a administração de compostos para diversos estudos, fármacos ou extratos naturais, em pequenas quantidades e o seu rastreamento num curto período de tempo (Benchoula et al., 2019).

Para além disso, o peixe-zebra apresenta semelhanças genéticas, anatómicas e fisiológicas com o ser humano (Zang et al., 2018). Compartilha 70% de homologia com mamíferos e 84% de similaridade com genes de doenças manifestadas em mamíferos (Benchoula et al., 2019). Este facto permite o uso do *Danio rerio* como organismo modelo de pesquisa em estudos, no qual se pretender entender as funções dos genes em algumas doenças, como por exemplo síndromes metabólicas, destacando a obesidade e a diabetes (Benchoula et al., 2019; Zang et al., 2018).

Por outro lado, o uso desta espécie como modelo experimental pode apresentar algumas dificuldades, como a solubilidade dos compostos administrados para estudo. No entanto, esta adversidade pode ser ultrapassada se os compostos testados forem solúveis preferencialmente em água, 1% de Dimetilsulfóxido (DMSO) ou acetona (Benchoula et al., 2019).

1.7.1. Peixe-zebra como modelo de estudo de síndrome metabólica

Danio rerio retrata um modelo interessante no estudo de doenças metabólicas, devido à conservação funcional no metabolismo de lípidos, biologia adiposa, estrutura do pâncreas e homeostase da glicose. Tornado possível a possível identificação de novos alvos associados aos riscos, mas também ao tratamento da obesidade e diabetes em humanos (Virote, 2020).

O pâncreas de peixe-zebra divide-se em duas partes distintas: exócrina e endócrina. A parte exócrina é constituída por três tipos diferentes de células, ductais, acinares e centroacinares (Benchoula et al., 2019). E a parte endócrina composta por células alfa (α), libertam glucagon, células beta (β), função de produzir insulina, e células delta (δ), originando somatostatina (Benchoula et al., 2019; Zang et al., 2018) . É, assim, possível afirmar que o pâncreas desta espécie apresenta uma estrutura semelhante à dos mamíferos (Benchoula et al., 2019). Sistemas orgânicos envolvidos na homeostase da glicose, tais como cérebro, fígado, tecido adiposo e músculos esqueléticos apresentam-se conservados nesta espécie (Zang et al., 2018). Da mesma maneira, que o nível normal de glicose no sangue de peixe-zebra encontra-se num intervalo aproximado do nível normal de glicose no sangue do ser humano, (50 - 75 mg/dL) e (70 - 120 mg/dL), respetivamente (Benchoula et al., 2019).

Desta forma, o peixe-zebra constitui um ótimo modelo para o estudo das diversas doenças metabólicas, nomeadamente as relacionadas ao metabolismo de glicose.

Como anteriormente referido, a obesidade apresenta efeitos adversos em diversas áreas, uma vez que aumenta o risco de outras doenças metabólicas, tais como hiperlipidemia, doenças cardiovasculares, diabetes tipo 2, e cancro (Benchoula et al.,

2019). Consequentemente, tornou-se necessário desenvolver modelos de pesquisa animal que permitissem o estudo desta disfunção metabólica e as suas comorbidades associadas. Modelos de ratinhos destacaram-se como sendo os modelos mais usados para o estudo de obesidade (Kennedy et al., 2010).

Contudo, larvas de peixe-zebra demonstram presença de adipócitos, com função de armazenamento de lípidos, e outras células relacionadas com o metabolismo lipídico (Zang et al., 2018). Embriões e larvas também apresentam para o metabolismo de hidratos de carbono genes codificados semelhantes aos dos mamíferos (Benchoula et al., 2019). Por fim, em comparação com os mamíferos, é possível destacar mais semelhanças. O excesso de nutrientes provoca uma relação direta no aumento dos níveis de triglicerídeos no plasma e a ocorrência de esteatose hepática (Zang et al., 2018).

Além do mais, apresentam fácil identificação e caracterização dos órgãos digestivos, tecido adiposo, músculos esqueléticos e vias endócrinas (Virote, 2020), a acrescentar as semelhanças em relação aos mamíferos (Benchoula et al., 2019)**.** Assim, o uso desta espécie está a aumentar dado as vantagens acima mencionadas, em comparação com outras espécies, nomeadamente os roedores, tornando-se um modelo de estudo apropriado para as diversas síndromes metabólicas, entre as quais a obesidade (Zang et al., 2018).

1.8. Objetivos da investigação

Este trabalho de investigação foi incorporado no projeto nacional ALGAVALOR. O desenvolvimento deste projeto contribuirá para a identificação de novos compostos bioativos a partir de microalgas com aplicação na saúde humana, mais concretamente no tratamento de doenças metabólicas.

Em particular, o objetivo do presente trabalho pode ser dividido em 3 objetivos principais: Analisar a espécie de microalga *Chlorococcum* sp. em relação ao seu potencial anti-esteatose e anti-inflamatório em modelos celulares *in vitro* e anti-diabetes e de redução da quantidade lipídica em larvas de peixe-zebra *in vivo*. Interpretar os diferentes resultados obtidos nos diversos bioensaios realizados em função das diferentes metodologias de extração da biomassa da microalga testada. E, por fim, realizar um perfil metabólico das amostras bioativas em contraste com as amostras não ativas. Consequentemente, esta abordagem é aplicada com o intuito de verificar a interação dos extratos com atividade com alguns alvos moleculares, identificando possíveis moléculas que implicam as bioatividades detetadas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Extratos da microalga *Chlorococcum* sp.

No âmbito de uma colaboração no projeto Nacional ALGAVALOR, os extratos da microalga *Chlorococcum* sp. foram fornecidos pela Universidade de Aveiro e Universidade do Minho, Portugal.

A Universidade de Aveiro realizou um ensaio experimental com recurso ao método de extração por alta pressão, em inglês por *high pressure processing* (HPP), sob amostras desidratadas da microalga *Chlorococcum* sp. fornecidas pela empresa Allmicroalgae. Foram aplicadas várias intensidades de pressão, 500, 420 e 300 MPa em combinação com tempos sob pressão longos (9 minutos e 15 minutos). E quatro solventes de extração distintos, água destilada, etanol 96% (v/v), etanol 48% (v/v) e acetona. A tabela 1 resume as condições de extração HPP selecionadas para a microalga em estudo.

A Universidade do Minho realizou a extração com tratamento óhmico, aplicação de campos elétricos moderados gerando calor *in situ*, conforme mostrado na Tabela 2. Na extração por tratamento óhmico a frequência de campo elétrico (50 Hertz (Hz) e 25000 Hz) e o tempo de tratamento (15 minutos, 30 minutos e 45 minutos) foram variados. Usando etanol 70% como solvente para a extração. Para comparação, uma extração convencional, sem frequência de campo elétrico, foi realizada, com um tempo de tratamento de 15 minutos, etanol 70% e temperatura de 25 ºC e 50 ºC.

Tabela 1 - Condições de extração por HPP selecionadas para o estudo da microalga Chlorococcum sp..

Extrato	Condições (Pressão/Tempo)	Solvente
CL1	500 MPa/15 min	Água
CL4		Etanol 48%
CL8		Etanol 96%
CL10		Acetona
CL14	420 MPa/9 min	Água
CL17		Etanol 48%
CL21		Etanol 96%
CL22		Acetona
CL25	300 MPa/15 min	Água
CL28		Etanol 48%
CL31		Etanol 96%
CL34		Acetona
CLC1	0 MPa/15 min	Água
CLC4		Etanol 48%
CLC7		Etanol 96%
CLC11		Acetona
CLC14	0 MPa/9 min	Água
CLC16		Etanol 48%
CLC20		Etanol 96%
CLC22		Acetona

Tabela 2 - Condições de extração por tratamento convencional e óhmico selecionadas para o estudo da microalga Chlorococcum sp..

Extrato	Tipo de tratamento	Frequência (Hz)	Tempo (min)	Temperatura (ºC)	Solvente
D51	Convencional	-	15	25	Etanol 70%
D61	Convencional	-	15	50	Etanol 70%
D71	Óhmico	25000	15	50	Etanol 70%
D81	Óhmico	50	15	50	Etanol 70%
D121	Óhmico	50	30	50	Etanol 70%
D131	Óhmico	50	45	50	Etanol 70%

2.1.1. Preparação de amostras

As amostras foram recebidas na forma de extrato seco liofilizado. Para a realização dos bioensaios planeados, as soluções stock das amostras extraídas por HPP, nas quais foram usados água e etanol 48% como solvente de extração, foram diluídas numa mistura de água e DMSO (1:1) em 10 mg/mL (VWR, USA). Já as amostras extraídas com os solventes acetona e etanol 96% foram diluídas em 100% DMSO em 10 mg/mL (Figura 4). Por outro lado, todas as soluções stock das amostras extraídas por tratamento óhmico foram preparadas em DMSO, na concentração final de 10 mg/mL (Figura 5). Em relação ao DMSO, o mesmo consiste num solvente orgânico, com uma vasta utilização em testes de toxicologia aquática e uma grande capacidade de solubilização (Chen, Wang, & Wu, 2011). Por fim, as amostras foram devidamente armazenadas num congelador a -20 ºC.

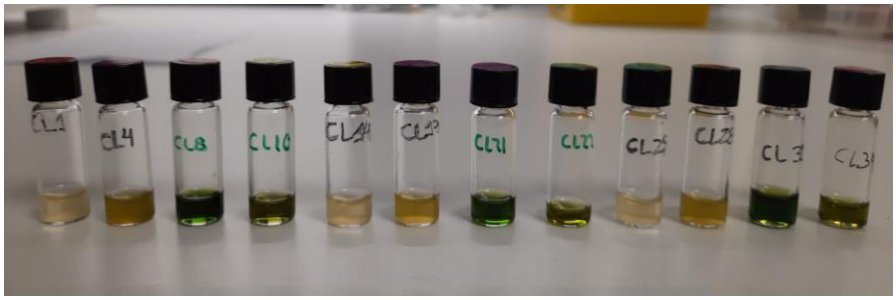

Figura 4 - Amostras extraídas por HPP com uma concentração de 10 mg/mL.

2.2. Ensaios *in vitro*

2.2.1. Ensaio anti-esteatose na linha celular HepG2

As células HepG2 foram incubadas no meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (Gibco, USA), suplementado com 0.1% de Fungicida Anfotericina B (MP Biomedicals, USA), 1% de Penicilina-Estreptomicina (Pen-Strep) (PAN-Biotech, Germany) e 10% de Soro Bovino Fetal (FBS) (PAN-Biotech, Germany), designado, assim, por DMEM Completo. A linha celular foi mantida a 37 ºC na incubadora humificada (5% de CO_2) (Thermo Fisher Scientific, USA) até apresentar um crescimento e confluência adequados.

Quando as células estavam confluentes, duas placas de 96 poços (Thermo Fisher Scientific, USA) foram semeadas com uma concentração celular final de $1 \cdot 10^5$ células por mL, com um volume total de 100 µL por poço. As células foram pré-incubadas por 24 horas na incubadora humificada a 37 ºC (5% de CO_2). Após a incubação, retirou-se cuidadosamente todo o volume dos poços com a pipeta multicanal e adicionou-se a cada poço 100 µL de DMEM incompleto (sem 10% de FBS) suplementado com uma solução de Oleato de Sódio (SO) (Sigma-Aldrich, USA), capaz de induzir a esteatose nas células, na concentração final de 62 µM em metanol filtrado (MeOH) (Fisher Scientific, USA),

exceto para os poços designados aos controlos sem Oleato de Sódio. Além disso, adicionou-se os extratos da microalga *Chlorococcum* sp. aos poços experimentais, em triplicado, na concentração final de 10 µg/mL e 25 µg/mL em ensaios independentes. O passo seguinte consistiu na incubação das células, durante 6 horas. Foram preparados dois controlos negativos (1. DMEM incompleto + DMSO; 2. DMEM incompleto + DMSO + MeOH, 0.5%) e um controlo solvente (DMEM incompleto + DMSO + SO).

Novamente, retirou-se cuidadosamente todo o volume dos poços com a pipeta multicanal, adicionou-se 100 µL de solução de meio *Hank's Buffered Salt Solution* (HBSS) com Hoechst (HO-33342) (1:100; 1 mg/mL em DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) e Nile Red (NR) (1:400; 0.5 mg/mL em DMSO) (Sigma-Aldrich, USA) por poço, durante 15 minutos. Removeu-se cuidadosamente todo o volume dos poços com a pipeta multicanal e adicionou-se 100 µL de HBSS por poço. Estas lavagens foram repetidas 3 vezes.

Por fim, efetuou-se a leitura da fluorescência (HO: Excitação: 360/40 nm - Emissão: 460/40 nm; NR: Excitação: 530/25 nm - Emissão: 590/35 nm), através de três medições distintas, *point fluorescence* (deteção de fluorescência apenas num ponto do poço) no leitor de microplacas Synergy HT (BioTek, USA), *area scan* (deteção de fluorescência numa área determinada, vários pontos) e *imaging* (recolha de quatro imagens, posteriormente processadas e analisadas para deteção a fluorescência de cada célula do poço), ambas no leitor de microplacas Cytation 5 Imaging reader (BioTek, USA).

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio Sulforhodamina B (SRB), usado para determinação da densidade celular com base na quantidade de proteína celular. Adicionou-se 25 µL de Ácido Tricloroacético (TCA) frio a 50% ao meio de cultura e incubou-se durante 1 hora a 4 ºC para fixar as células. Após 1h, as células foram lavadas 4 vezes com água destilada (dH_2O), para remover todo o TCA, e secas durante a noite à temperatura ambiente.

No dia seguinte, 100 µL de solução Sulforhodamina B (SRB) (MP Biomedicals, USA) (0,4% em Ácido Acético 1%) (MP Biomedicals, USA) foram adicionados e incubou-se por 15 minutos à temperatura ambiente para corar as células. Descartou-se o excesso de corante e realizou-se 4 lavagens sucessivas com Ácido Acético a 1%, para remover todo o SRB não ligado. Secou-se a placa à temperatura ambiente. Finalmente, solubilizou-se o corante ligado com 100 µL de tampão Tris-HCl (10 mmol/L; pH = 10.5). E ocorreu a leitura da absorvância, no leitor de microplacas Synergy H,T com dois comprimentos de onda de excitação diferentes, 492 nm com referência a 554 nm (Vichai & Kirtikara, 2006).

2.2.2. Ensaio anti-inflamação na linha celular RAW264.7

Neste ensaio foram utilizadas células RAW264.7, linhagem celular semelhante a monócitos/macrófagos (Kong, Smith, & Hao, 2019), originadas da linha celular de ratinhos. Além disso, são capazes de desenvolver resposta inflamatória, através da estimulação com um lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (Kong et al., 2019). LPS corresponde a um lipopolissacarídeo presente na parede celular de bactérias Gram-negativas, com a capacidade de induzir resposta inflamatória em macrófagos, como por exemplo, secreção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-α, IL-1, IL-6) (Cao et al., 2019).

Inicialmente, procedeu-se à incubação da linha celular em estudo no meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 0.1% de Fungicida Anfotericina B, 1% de Penicilina-Estreptomicina (Pen-Strep) e 10% de Soro Bovino Fetal (FBS) inativado, DMEM completo para a linhagem RAW264.7. As células foram mantidas a 37 ºC na incubadora humificada (5% de CO_2) até apresentarem um crescimento e confluência adequados. No momento em que as células apresentaram confluência, semeou-se duas placas de 96 poços, com uma concentração celular final de $3.5 \cdot 10^5$ células por mL, com um volume total de 100 µL por poço. As células foram novamente incubadas durante 24 horas, antes do início da exposição aos extratos da microalga *Chlorococcum* sp.. Posteriormente, o volume dos poços foi removido cuidadosamente e renovado, com uma pipeta multicanal. Para estudar o efeito anti-inflamatório (potencial capacidade de os extratos reduzirem a inflamação induzida nas células) e o efeito pro-inflamatório (verificação da reação basal das células aos extratos), cada extrato da microalga foi adicionado em quadruplicado, em ambos os ensaios.

Foram realizados ensaios independentes com concentrações distintas de 10 µg/mL e 25 µg/mL, com uma percentagem de DMSO de 0.1% e 0.4%, respetivamente. Por fim, foi adicionado, em quadruplicado, 5 µL de LPS (Sigma-Aldrich, USA) a cada poço (concentração final de 1 µg/mL) de uma *working solution* de 20 µg/mL em DMEM completo. Incubação da placa durante 22 horas na incubadora humidificada a 37 ºC (5% de CO_2). Em cada ensaio anti-inflamatório realizado existiu um controlo negativo (DMSO) e um controlo solvente (DMSO + LPS). Por outro lado, nos ensaios pro-inflamatório realizados existiu um controlo DMSO, controlo solvente, e um controlo negativo (DMSO + LPS). Em ambos os casos, DMSO (usado para a diluição dos extratos da microalga) foi adicionado no mesmo volume que os extratos foram adicionados em cada poço para cada ensaio. Após as 22 horas de incubação, transferiu-se 75 µL de meio de cultura, da placa semeada anteriormente, para uma nova placa de 96 poços, correspondente a cada uma das concentrações em estudo. Com o auxílio de uma pipeta multicanal, adicionou-se a cada poço 75 µL de reagente de Griess para quantificar os níveis de Óxido Nítrico

(NO). Este reagente o é composto por Sulfanilamida (10 mg/mL) (Sigma-Aldrich, USA), Etilenodiamina (Dicloridrato de N- (1-Naftil) Etilenodiamina) (1 mg/mL) (Honeywell, USA) em Ácido Fosfórico (H3PO4) (Acros Organics, USA) a 2%. Seguindo-se uma incubação, durante 10 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Para finalizar, efetuou-se a leitura da absorvância a 562 nm, com o leitor de microplacas Synergy HT. Nos ensaios anti-inflamatório todos os valores obtidos foram normalizados com o controlo solvente (DMSO + LPS). Em contrapartida, nos ensaios pro-inflamatório os valores obtidos foram normalizados com o controlo DMSO, controlo solvente.

A viabilidade celular foi determinada para avaliar possíveis efeitos citotóxicos ou colaterais nas células. Assim, foi realizado o ensaio MTT. Após retirar os 75 µL para uma nova placa para determinação de NO, rejeitou-se o sobrenadante, com o auxílio de uma pipeta multicanal. Adicionou-se a cada poço 100 µL de solução de MTT, aquecida a 37 ºC, (0.5 µg/mL em DMEM não estéril, sem 10% FBS e 1% Pen-Strep) (Duchefa Biochemie, Netherlands) e procedeu-se à incubação da placa, na incubadora humidificada a 37 ºC (5% de CO_2), durante 45 minutos. Para terminar, o sobrenadante foi rejeitado e adicionou-se 100 µL de DMSO, homogeneizando-se adequadamente. Realizou-se a leitura do produto formado (sais de formazano) a 510 nm, com o leitor de microplacas Synergy HT. Todos os valores obtidos foram normalizados com o controlo solvente (DMSO + LPS).

2.3. Ensaios *in vivo*

2.3.1. Manutenção e preparação das larvas de peixe-zebra

Embriões de peixe-zebra foram recolhidos no Biotério de Organismos Aquáticos (BOGA), departamento especializado do Centro Interdisciplinar de Investigação Marinha e Ambiental (CIIMAR), responsável pela criação, desenvolvimento e manutenção de animais de laboratório aquáticos em condições de segurança ambientais, sanitárias e nutricionais. Desta forma, os ovos de peixe-zebra foram coletados no dia da fecundação (dia 0), onde se procedeu à limpeza manual, com vista a descartar ovos mortos (detetáveis através da sua cor branca), impurezas e fezes, e incubação a 28 ºC num aquário. No dia 1 DPF, os embriões foram colocados manualmente em placas de Petri, com uma densidade máxima de 40 embriões por placa, com 20 mL de uma solução composta por *Egg water* (60 µg/mL de sais marinhos “Instant Ocean” em água destilada) e 200 µM de 1-Fenil-2-Tioureia (PTU) (Sigma-Aldrich, USA), composto capaz de suprimir a melanização dos embriões (Malicki et al., 2011), resultando em larvas semitransparentes. Posteriormente, os embriões foram incubados novamente a 28 ºC.

2.3.2. *Screening* de extratos da microalga *Chlorococcum* sp. com potencial atividade anti-obesidade em larvas de peixe-zebra

No 3 DPF, embriões mortos e cascas de ovos foram removidos das placas de Petri. Em seguida, larvas de peixe-zebra, com o mesmo estado de desenvolvimento, foram transferidas para uma placa de 48 poços (Thermo Fisher Scientific, USA), com uma densidade de 6 a 8 larvas por poço. Com uma seringa removeu-se o meio do poço, deixando um volume restante de 125 µL. Logo após, iniciou-se a exposição aos extratos da microalga *Chlorococcum* sp. e os restantes compostos. Assim, foram adicionados a cada poço 312.5 µL de *Egg water* + PTU, 0.75 µL de extrato de microalga (concentração final de 10 µg/mL, 0.1% DMSO), DMSO (0.1%; controlo solvente) ou Resveratrol (REV) (concentração final de 50 µM; controlo positivo) (Focus Biomolecules, USA), apresentando este último propriedades anti-obesidade (Öztürk et al., 2017). No fim desta etapa, 312.5 µL de *Egg water* + PTU foram adicionados novamente a cada poço e a placa foi incubada a 28 ºC.

Ao fim de 24 horas (4 DPF), procedeu-se à renovação de *Egg water* + PTU e dos extratos da microalga, DMSO e REV, como também à remoção de larvas mortas ou com deformações. Para além disso, a cada poço adicionou-se 15 µL de uma *work solution* de Nile Red (concentração final de 0.01 µg/mL). Seguindo-se a incubação dos embriões a 28 ºC, ao abrigo da luz. Nile Red apresenta-se como um distinto corante capaz de avaliar o conteúdo lipídico intracelular por microscopia de fluorescência (Zhao et al., 2019).

No 5 DPF, as larvas de peixe-zebra foram anestesiadas com Tricaína (MS-222, concentração final 0.03%) (Acros Organics, USA), adição de 15 µL a cada poço, com vista à imobilização das mesmas durante a análise no microscópio de fluorescência, Leica DM6000 FS (Leica Microsytems, Germany).

2.3.3. Screening de extratos da microalga *Chlorococcum* sp. com potencial atividade anti-diabetes em larvas de peixe-zebra

No 3 DPF, embriões mortos e cascas de ovos foram removidos das placas de Petri. Em seguida, larvas de peixe-zebra, com o mesmo estado de desenvolvimento, foram transferidas para uma placa de 96 poços, com uma densidade de 5 larvas por poço. Com uma seringa removeu-se o meio do poço, deixando um volume restante de 30 µL. Imediatamente, ocorreu a exposição das larvas, durante 1 hora, a 85 µL de *Egg water*, 4 µL de extrato de microalga (concentração final de 10 µg/mL, 0.1% DMSO), DMSO (0.1%; controlo solvente) ou EMODIN (10 µM; controlo positivo) (TargetMol, USA). Segundo a literatura, EMODIN é um composto que possui atividades anti-inflamatórias e potencial anti-diabético. Pode contribuir para a manutenção do metabolismo de glicose no

tecido adiposo, melhorando a tolerância à glicose e aumentando a sensibilização à insulina, através da ativação de alguns recetores, como PPAR γ (X. Zhang et al., 2015).

Posteriormente, o meio dos poços foi removido com o auxílio de uma seringa e foram adicionados (ao abrigo da luz) 170 µL de 2-NBDG (200 µM) (Invitrogen, USA) em *Egg water* + PTU, ocorrendo uma exposição de 3 horas a uma temperatura de 28 ºC e ao abrigo da luz, uma vez que o composto 2-NBDG é extremamente sensível à luz. 2-NBDG é um análogo fluorescente da glucose, usado para monitorizar o *uptake* de glucose em ensaios experimentais para estudos relacionados com diabetes *mellitus* (Zou, Wang, & Shen, 2005).

Por último, efetuou-se o procedimento de lavagens, consistindo na remoção do meio de cada poço e renovação com *Egg water*, sucessivamente, com vista a tornar o meio dos poços o mais transparente possível, de modo a não interferir na análise ao microscópio. Concluído este passo, as larvas de peixe-zebra foram anestesiadas com Tricaína (MS-222, 0.03%), adição de 4 µL a cada poço, com vista à imobilização das mesmas durante a análise no microscópio de fluorescência, Olympus BX41 (Olympus, Germany).

2.3.4. Análise e quantificação de imagens

Para cada poço, as larvas mortas ou com deformações foram descartadas, e as vivas transferidas para um lâmina de vidro côncava, com a remoção da água em excesso para ajustar a posição das larvas. No início de cada quantificação a intensidade de fluorescência foi ajustada com o controlo DMSO (no caso do ensaio anti-obesidade) e com controlo EMODIN (no caso do ensaio anti-diabetes), mantendo-se a mesma intensidade para todos os outros grupos do mesmo ensaio. Por último, a intensidade de fluorescência presente na área do intestino/saco vitelino (ensaio anti-obesidade), saco vitelino e olho (ensaio anti-diabetes) de cada larva foi quantificada por meio de um *plug-in* adaptado no software Image J. Cada larva de peixe-zebra foi considerada uma réplica. Os valores obtidos foram necessários para calcular a percentagem de *uptake* de glucose (ensaio anti-diabetes), como também de redução da quantidade lipídica (ensaio anti-obesidade) nas larvas de peixe-zebra, em comparação às larvas expostas com DMSO, em ambos os ensaios acima descritos.

2.4. Western Blot

2.4.1. Preparação de amostras

Para este procedimento foi usada a linha celular HepG2, presente no ensaio anti-esteatose, descrito no ponto 2.2.1.1. Após a incubação das células durante 6 horas, antecipada da exposição aos extratos da microalga *Chlorococcum* sp. (concentração final de 25 µg/mL) e ao Oleato de Sódio, removeu-se cuidadosamente o meio dos poços, adicionou-se 300 µL de Triplex, para desprenderem as células do fundo do frasco de cultivo, e adicionou-se 10 mL de DMEM completo. Centrifugou-se as células, dispersas no meio, durante 5 minutos, a 1200 rotações por minuto (rpm). Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em 1 mL de DMEM completo, transferindo-se para vários Eppendorfs Precellys. Posteriormente, as amostras foram colocadas na centrífuga (VWR, USA) a 4 ºC, durante 1 minuto, a 13.000 rpm, com o objetivo de depositar as células no fundo do Eppendorf. Por fim, removeu-se todo o sobrenadante e armazenou-se o *pellet* (células) a -80 ºC.

2.4.2. Extração de proteína

Adicionou-se a cada Eppendorf 198 µL de tampão de lise RIPA (5 M Cloreto de Sódio (NaCl) (Panreac, Spain); 0.5 M Ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA), pH 8.0 (PanReac AppliChem, Germany); 1 M Tris-HCl, pH 8.0 (Affymetrix, USA); IGEPAL® CA-630 (Sigma-Aldrich, USA); 10% Desoxicolato de sódio (Sigma-Aldrich, USA); 10% SDS (Sigma-Aldrich, USA) e dH_2O) e 2 µL de Inibidor de Protease & Fosfatase (Thermo Fisher Scientific, USA). Colocou-se as amostras no Precellys Evolution (Bertin Technologies, France), onde foram realizados dois ciclos de 30 segundos a 5000 rpm cada um, com a adição de uma *bit* por Eppendorf. Após este procedimento, as amostras permaneceram 1 hora no gelo. Com vista a proceder à separação das proteínas (sobrenadante) dos resto das células (*pellet*), centrifugou-se as amostras a 4 ºC, durante 15 minutos, a 13.000 rpm. Transferiu-se o sobrenadante para um novo Eppendorf.

2.4.3. Medição da concentração de proteína (Método Bradford)

Dado que o Bradford reage com o tampão RIPA, as amostras foram diluídas em água (1:10). Preparou-se uma curva padrão de BSA (Albumina Sérica Bovina) (Sigma-Aldrich, USA) em RIPA (1:10 em água), através de diluições em série de 10 a 0,0781 mg/mL em 8 etapas de diluição. Numa placa de 96 poços adicionou-se 5 µL de amostra ou *standards* a cada poço, duas réplicas para ambos. Para além disso, existiram duas réplicas para o controlo solvente RIPA (1:10 em água) e outras duas para o branco. Adicionou-se 250 µL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, USA) a cada poço.

Incubou-se a placa durante 15 minutos e realizou-se a leitura da absorbância a 595 nm no leitor de placas Synergy HT.

2.4.4. Gel de eletroforese e Assemble iBlot TM 2 Transfer

Preparou-se uma mistura com 7.5 µL *Loading buffer* (4x) (Invitrogen, USA) e 3 µL R*educing buffer* (10x) (Invitrogen, USA), numa quantidade total de proteínas de 20 µg e um volume total de 30 µL. As amostras permaneceram durante 10 minutos no Thermomixer compact (Eppendorf, Germany), a 97ºC. Em seguida, transferiu-se os Eppendorfs para o gelo. Depois de se efetuar a lavagem da cassette, (NuPage™ 3-8% Tris-Acetate Gel) ou (NuPage™ 4-12% Tris-Acetate Gel) (Invitrogen, USA), com dH_2O, remover a fita autocolante e retirar o pente, colocou-se a mesma dentro da câmara com *running buffer* (MOPS ou SDS Tris Acetate). Carregou-se um poço com Ladder Mix (mistura de 1 µL MagicMark™ XP (Invitrogen, USA) com 2.5 µL de SeeBlue Standard (Invitrogen, USA)) com 7.5 µL *Loading buffer* (4x). Imediatamente, as amostras foram também carregadas (uma por poço), 20 µL em cada poço. Realizou-se a corrida durante 1 hora, 170 V. Retirou-se o gel da cassette cuidadosamente e colocou-se o mesmo em água. Para finalizar, através do dispositivo iBlot ™ 2 Gel Transfer (Thermo Fisher Scientific, USA), efetuou-se a transferência de proteínas do gel para a membrana, iBlot® 2 NC Mini Stacks, (Invitrogen, USA). A transferência ocorreu segundo os seguintes parâmetros: 20V - 2 min; 23 V - 8 min e 25 V - 3 min. No final, colocou-se a membrana em dH_2O, após destacar o excesso.

2.4.5. Coloração com Ponceau e *blocking*

Inicialmente, lavou-se a membrana com dH_2O. Com o objetivo de verificar a qualidade da transferência realizada, colocou-se a membrana, durante 12 segundos, numa solução Ponceau (0.1% (w/v) Ponceau S (Sigma-Aldrich, USA) em 5% (v/v) Ácido Acético). Em seguida, lavou-se a membrana com dH_2O, para retirar o excesso de Ponceau e tornar as bandas de proteína mais visíveis. Após verificar as bandas, imergiu-se a membrana em *Phosphate Buffered Saline with Tween* (PBST) (Cell Signaling Technology, USA), até ser retirada toda a coloração. Com vista a bloquear *non-specific binding* presentes na membrana, esta foi colocada em agitação, durante 1 hora, em leite (5% em PBST) (PanReac AppliChem, Germany) ou BSA (3% em PBST) para anticorpos fosforilados.

2.4.6. Anticorpo primário e secundário

Ao fim de 1 hora, retirou-se a membrana do *blocking* e procedeu-se à sua lavagem com PBST. Seguidamente, colocou-se a membrana num falcon de 50 mL, contendo 5 mL de leite (5% em PBST) ou BSA (3% em PBST) e a respetiva concentração de anticorpo primário a usar. A membrana permaneceu em rotação a 4 ºC, durante a noite. No dia seguinte, removeu-se a membrana do anticorpo primário e lavou-se a mesma três vezes, 10 minutos, com PBST. Novamente, colocou-se a membrana num falcon de 50 mL, contendo 5 mL de leite (5% em PBST) ou BSA (3% em PBST) e a respetiva concentração de anticorpo secundário a usar. Por fim, retirou-se a membrana do anticorpo secundário, procedendo-se às lavagens com PBST, três lavagens durante 10 minutos cada. A tabela 3 retrata os anticorpos primários e secundários utilizados e as respetivas concentrações.

É importante salientar a utilização de BSA (3% em PBST), anteriormente referido, sempre que implicava o uso dos seguintes anticorpos, PRKA-β1 fosforilado e ACACα fosforilado.

Tabela 3 - Resumo dos anticorpos primários e secundários utilizados durante o estudo.

Anticorpo primário	Diluição	Anticorpo secundário	Diluição
CEBPα (Antibody Verify, USA)	1:1000	Anti-Rabbit IGg (Elabscience, USA)	1:5000
ACACα (Antibody Verify, USA)	1:500	Anti-Rabbit IGg	1:2500
PPAR γ (Antibody Verify, USA)	1:500	Anti-Rabbit IGg	1:5000
PRKA-β1 (Antibody Verify, USA)	1:500	Anti-Rabbit IGg	1:2500
PRKA-β1 Phospho-Ser181 (Antibody Verify, USA)	1:1000	Anti-Rabbit IGg	1:5000
ACACα Phospho-Ser80 (Antibody Verify, USA)	1:2000	Anti-Rabbit IGg	1:5000
β-actina (Sigma-Aldrich, USA)	1:4000	Anti-β-actina, Mouse (Sigma-Aldrich, USA)	1:25000

2.4.7. Revelação da membrana e *stripping*

Uma mistura composta por 1 mL de solução Luminol/Enhancer (Bio-Rad, USA) e 1 mL de Peroxide solution (Bio-Rad, USA) foi adicionada à membrana durante 5 minutos. A membrana foi inserida no Las-4000 mini (Fujifilm, Japan), para deteção e quantificação de quimioluminescência, onde foi exposta ao um *increment* de 10 segundos, para avaliar a intensidade do sinal do anticorpo e, em seguida, a um *precision* de maior duração. No final deste procedimento, a membrana foi colocada em PBST. Para finalizar, a membrana foi imersa em *Stripping buffer* (Thermo Fisher Scientific, USA) durante 5 minutos, com agitação. Lavou-se a mesma três vezes, 10 minutos, com PBST. Secou-se a membrana à temperatura ambiente e armazenou-se a 4 ºC. Cada membrana foi reutilizada no máximo duas vezes.

2.5. Perfil metabólico

2.5.1. Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS)

No que se refere à preparação de amostras para análise dos perfis metabólicos, as soluções stock foram diluídas em Acetonitrila (ACN) (Carlo Erba Reagents, Spain), com uma concentração final de 1 mg/mL. Todas as amostras foram previamente secas no rotavapor (BUCHI, Switzerland) e ressuspensas em Acetonitrila, com uma concentração final de 1 mg/mL. Em seguida, 200 µL foram filtrados com filtros de seringa, diâmetro de 0.2 µm (Millex Syringe Filter, Merck Millipoore Millex™, Germany), para *vials* de 2 mL (Millex Syringe Filter, Merck Millipoore Millex™, Germany). A análise LC-MS/MS foi realizada pelo Orbitrap Exploris 120 Mass Spectrometer (Thermo Scientific™, USA) acoplado a uma coluna ACE UltraCore 2.5 SuperC18 (50x2.1 mm; 5 µm ACE® UltraCore™, Scotland), com uma fonte de Ionização *Electrospray* (ESI), operado em modo positivo e controlado por Xcalibur 4.4.16.14 (Thermo Scientific™, USA). Cada amostra foi injetada com um volume de 5 µL e as amostras foram eluídas com um gradiente de 99.5% da fase móvel A (95% H_2O + 5% MeOH + 0.1% de Ácido Fórmico), diminuindo a fase móvel A para 10% e aumentando a fase móvel B para 90% aos 9.5 minutos. Em seguida, a fase móvel A aumentou para 99.5% e a fase móvel B diminuiu para 0.5% aos 17 minutos. O gradiente foi estabelecido com uma taxa de fluxo de 0.35 mL/min durante 20 minutos. A temperatura de separação foi de 40 ºC durante toda a análise.

Figura 5 - Amostras extraídas por tratamento convencional e óhmico com uma concentração de 10 mg/mL.

2.5.2. Molecular *networking* e análise metabolómica

Com o programa de software MSConvert, os dados com o formato original RAW foram convertidos para o formato mzXML. Os dados convertidos foram carregados no *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) (https://gnps.ucsd.edu; acedido em 04/07/2021), através do software WinSCP. No GNPS, através das ferramentas *Dereplicator*, *Dereplicator* + e *MolNetEnhancer*, existiu uma comparação automática dos picos de massa obtidos por LC-MS/MS com os picos de massa que constituem a *database* do GNPS. Foram usadas outras plataformas públicas, como *Natural Products Atlas* (NPA) (https://www.npatlas.org/search/basic; acedido em 04/07/2021) e *Dictionary of Natural Products* (DNP) (https://dnp.chemnetbase.com; acedido em 04/07/2021), utilizando o *precursor mass* +/- 0.002 dos metabólitos como método de pesquisa, para os picos de massa que não obtiveram correspondência no GNPS e na suas extensões. Para terminar, o erro *m/z* foi calculado em partes por milhão (ppm).

O *molecular networking* foi gerado na plataforma GNPS com os seguintes parâmetros: *Precursor Ion Mass Tolerance* (PIMT) e *Fragment Ion Mass Tolerance* (FIMT) definidos para 0.02 Da (equipamento de alta resolução como qTOF ou Orbitrap), *Min Pairs Cos* definido para 0.7 e *Minimum Matched Fragment Ions* definido para 6. O *networking* obtido visualizado e analisado no programa Cytoscape. Com o objetivo de identificar compostos ou *clusters*, conhecidos ou não conhecidos da literatura, que possam ter contribuído para as bioatividades observadas referentes aos extratos da microalga *Chlorococcum* sp., foi necessário investigar os metabólitos presentes nas amostras com atividade e sem atividade, como método de comparação.

2.6. Análise estatística

A realização da análise estatística foi efetuada através do programa GraphPad Prism 8. Os testes de normalidade Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov ($p < 0.05$) foram realizados com o intuito de verificar a normalidade e homogeneidade de variância das amostras. Se os valores demonstrassem uma distribuição normal e variância igual, a diferença entre o grupo de controlo selecionado (DMSO) e os restantes grupos foi analisada por One-Way ANOVA com Bartlett's, seguido pelo teste post-hoc de Dunnett ($p < 0.05$). Na condição de os dados não corresponderem a uma variância igual, uma outra análise foi realizada, teste One-Way ANOVA com Brown-Forsythe e Welch. Caso os valores não seguissem uma distribuição normal, o teste de Kruskal-Wallis, para distribuição não paramétrica de valores, foi aplicado para obter valores estatisticamente diferentes, usando o teste post-hoc de Dunn´s (p valor < 0.05). Graficamente os dados foram representados por *box-whisker plots*, com valores de percentis 5-95 e os grupos com diferenças significativas foram assinaladas com o símbolo: * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ e **** = $p < 0.0001$.

3. Resultados

3.1. Ensaio anti-esteatose na linha celular HepG2

3.1.1. Amostras Universidade de Aveiro

As amostras da microalga *Chlorococcum* sp. fornecidos pela Universidade de Aveiro, extraídos por HPP, foram analisados em relação à capacidade de redução de lípidos e prevenção da esteatose nas células HepG2 *fat-overloaded*. Os resultados obtidos foram comparados em relação ao controlo solvente (DMSO + SO) e expressos em % de conteúdo lipídico.

Em seguida, apresentam-se os resultados referentes à comparação de 3 metodologias de análise de dados (Figura 6), *point fluorescence*, *area scan* e *imaging*, analisada em duas concentrações, 10 µg/mL e 25 µg/mL. Um ensaio independente foi realizado para cada concentração, com três réplicas para cada amostra (n total = 3).

Apenas na análise *point fluorescence* verificou-se resultados estatisticamente significativos. Na concentração final de 10 µg/mL, Figura 6, a amostra CL22 reduziu em 50% a quantidade lipídica presente nas células. Na concentração final de 25 µg/mL, Figura 7, a mesma amostra e a amostra CL4, extraída com o solvente etanol 48%, reduziram em 40% a percentagem de lípidos. Já a amostra CL1, extraída com o solvente água, amostra CL10, extraída com o solvente acetona, e a amostra CL21, extraída com o solvente etanol 96%, efetuaram uma redução de 20%. Por fim, a amostra CL25, extraída com o solvente água, efetuou uma redução de 40%. No entanto, os resultados obtidos não são confiáveis, representando falsos positivos, visto que a distribuição das células HepG2 no poço não é homogenia e a metodologia *point fluorescence* apenas deteta fluorescência num único ponto do poço, ponto central.

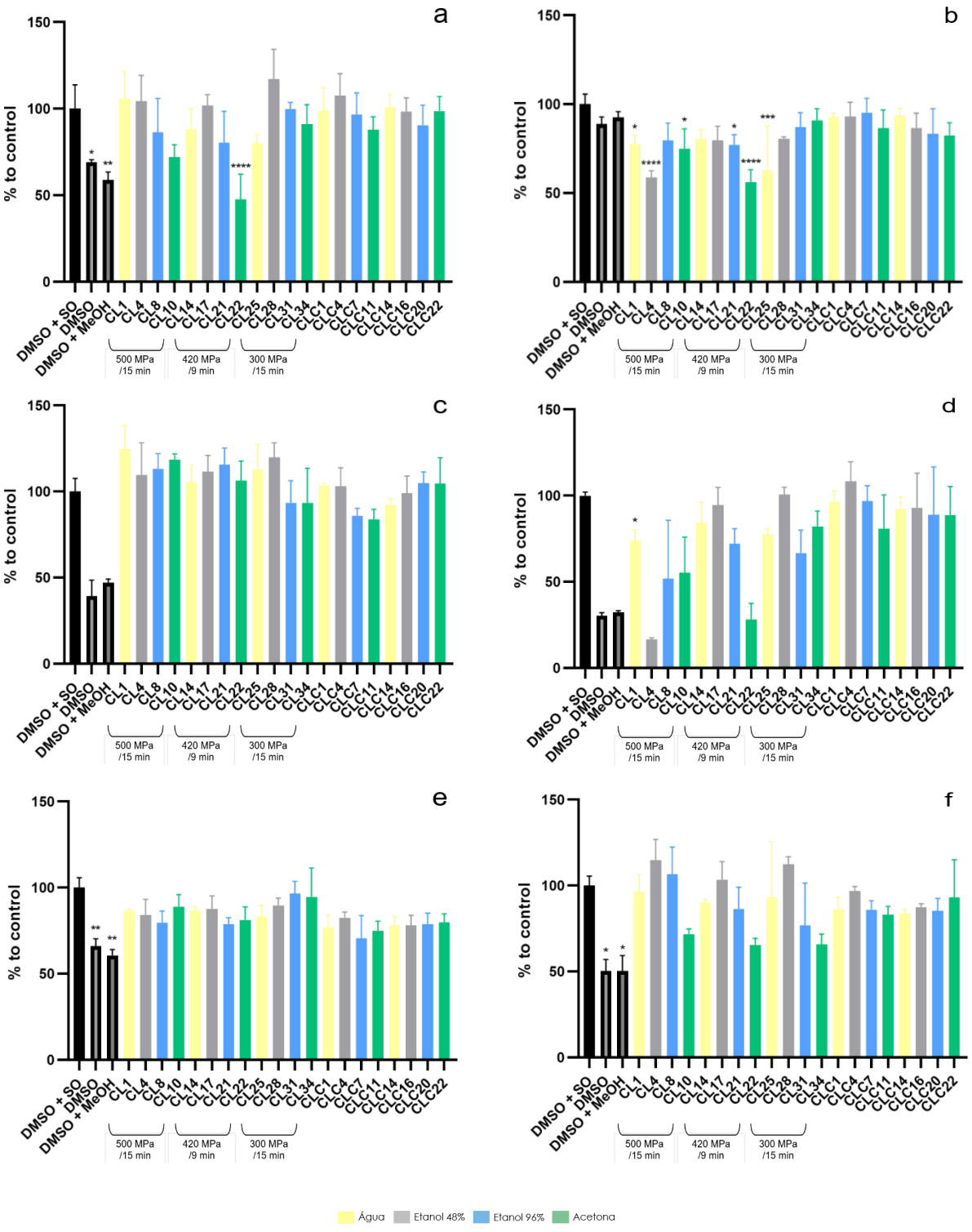

*Figura 6 - Atividade anti-esteatose de extratos da microalga Chlorococcum sp., extraídos por alta pressão hidrostática. a) metodologia point fluorescence na concentração final 10 µg/mL; b) metodologia point fluorescence na concentração final 25 µg/mL; c) metodologia area scan na concentração final 10 µg/mL; d) metodologia area scan na concentração final 25 µg/mL; e) metodologia imaging na concentração final 10 µg/mL; f) metodologia imaging na concentração final 25 µg/mL. Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + SO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001.*

A metodologia *area scan* e, em particular, o *imaging* são metodologias mais adequadas teoricamente, no sentido de redução do erro e da variabilidade dos resultados, uma vez que uma maior área do poço é analisada. Na metodologia *imaging* foi possível observar as células HepG2 *fat-overloaded*. Na Figura 7, o conteúdo lipídico no citoplasma das células, corado pelo NR, apresenta-se com a cor laranja e o núcleo das células, corado pelo HO-33342, está representado com a cor azul.

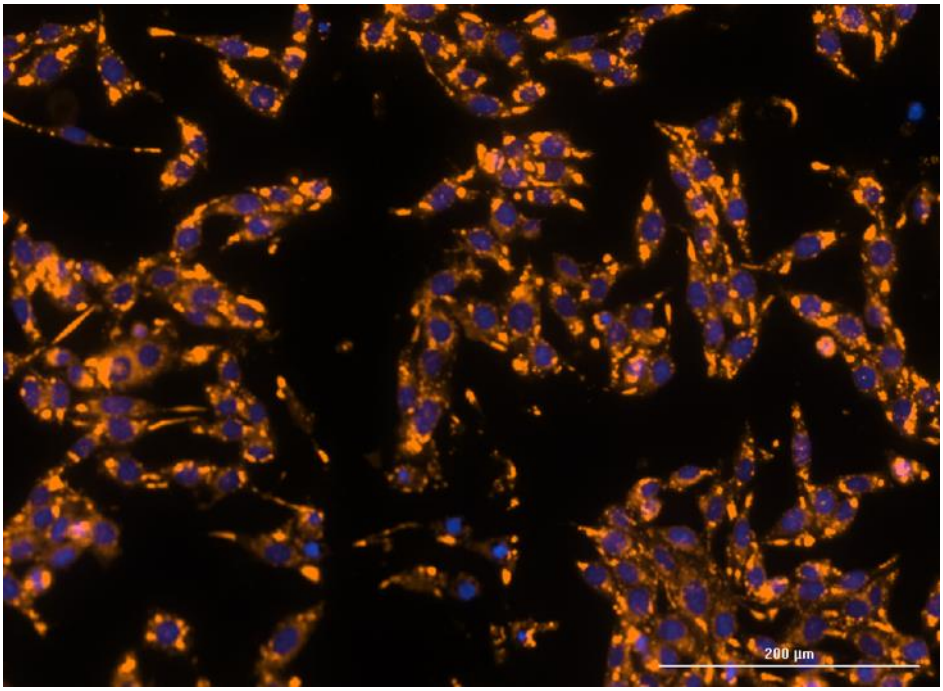

Figura 7 - Células HepG2 fat-overloaded visualizadas no microscópio de fluorescência.

Relativamente à metodologia mais adequada, *imaging*, dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, com três réplicas para cada amostra (n total = 6). Na concentração final de 10 µg/mL (Figura 8a), verificou-se que apenas uma amostra das 20 testadas apresentou um resultado estatisticamente significativo, reduzindo a percentagem de lípidos em comparação com o controlo solvente (100%). A amostra CLC11 extraída com o solvente acetona, sem pressão administrada/15 min, reduziu em 20% a quantidade lipídica presente nas células. Ao analisar os resultados para a concentração final de 25 µg/mL (Figura 8b), verificou-se que a amostra CL10 (500 MPa/15 min) provocou uma redução de 40% na intensidade média de fluorescência do NR. No entanto, outra amostra extraída com o solvente acetona, CL22 (420 MPa/9 min), reduziu também a percentagem lipídica nas células em 40%, comparando com o controlo solvente (100%). Desta forma, verificou-se que as condições de extração, nomeadamente o solvente e a intensidade de pressão, dos extratos da microalga *Chlorococcum* sp. influenciou a redução da percentagem lipídica das células

HepG2. Os resultados obtidos apresentam-se bastante promissores, uma vez que o controlo negativo (DMSO sem Oleato de Sódio) possuiu uma percentagem de conteúdo lipídico de 50%, comparando com o controlo solvente (100%). Assim, seria interessante efetuar um estudo para elucidar os mecanismos moleculares e possíveis metabólitos que levam à atividade observada anteriormente.

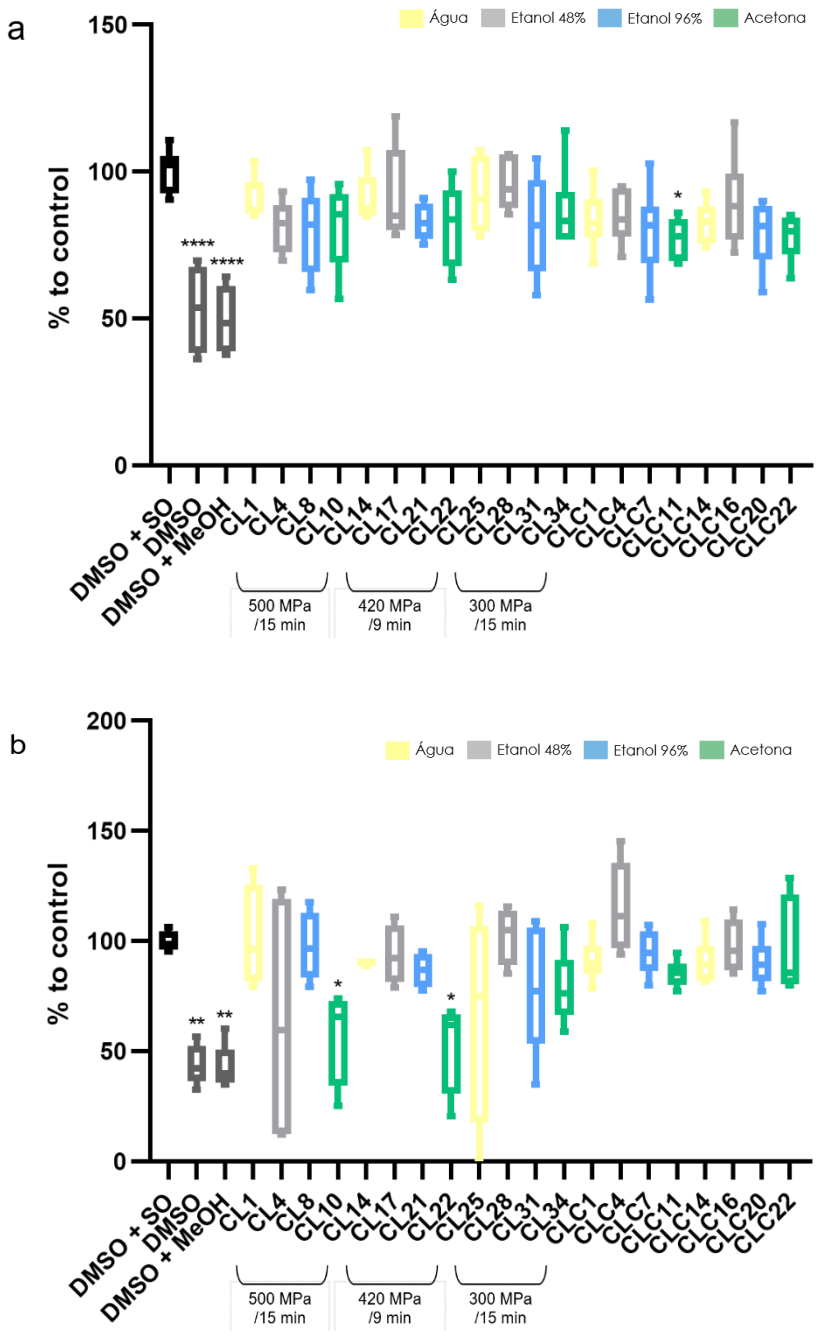

*Figura 8 - Atividade anti-esteatose de extratos da microalga Chlorococcum sp., extraídos por alta pressão hidrostática, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + SO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001.*

Na Figura 9 é possível observar os efeitos já mencionados anteriormente das amostras CL10 e CL22, redução do conteúdo lipídico presente nas células HepG2, comparativamente com as células presentes no controlo negativo e controlo solvente, *fat-overloaded*.

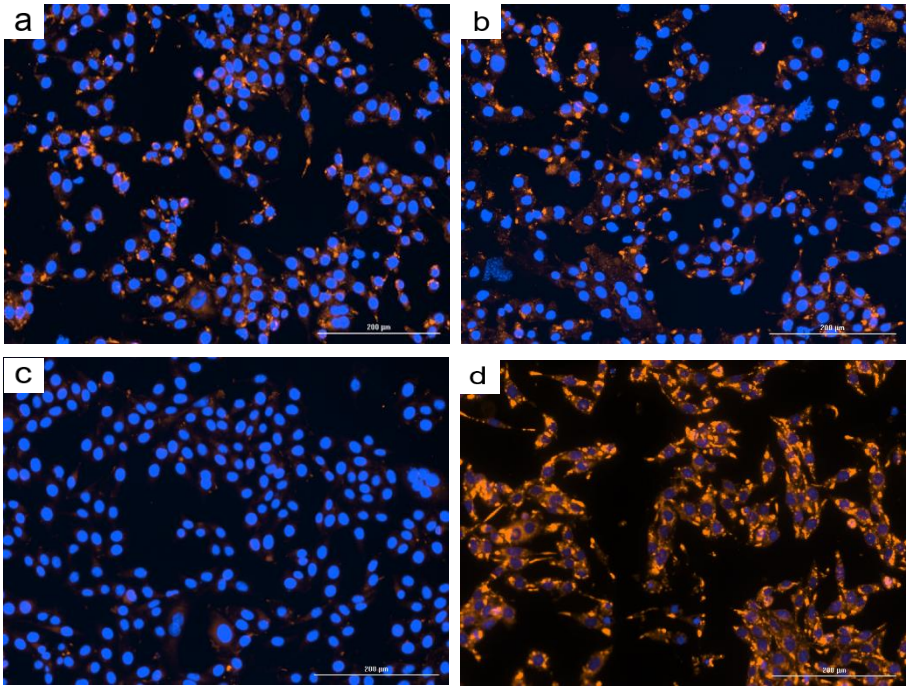

Figura 9 - Células HepG2 visualizadas no microscópio de fluorescência. a) células tratadas com a amostra CL10; b) células tratadas com a amostra CL22; c) células pertencentes ao controlo negativo; d) células fat-overloaded.

Em relação à citotoxicidade das células HepG2 nas concentrações testadas (Figura 10), 10 µg/mL e 25 µg/mL, nenhuma amostra reduziu significativamente a viabilidade das células. Na concentração final de 25 µg/mL (Figura 10b), as amostras extraídas pelo solvente acetona, CL10, CL34 e CLC22, e pelo solvente etanol 96%, CL31 e CLC20, aumentaram ligeiramente a viabilidade celular.

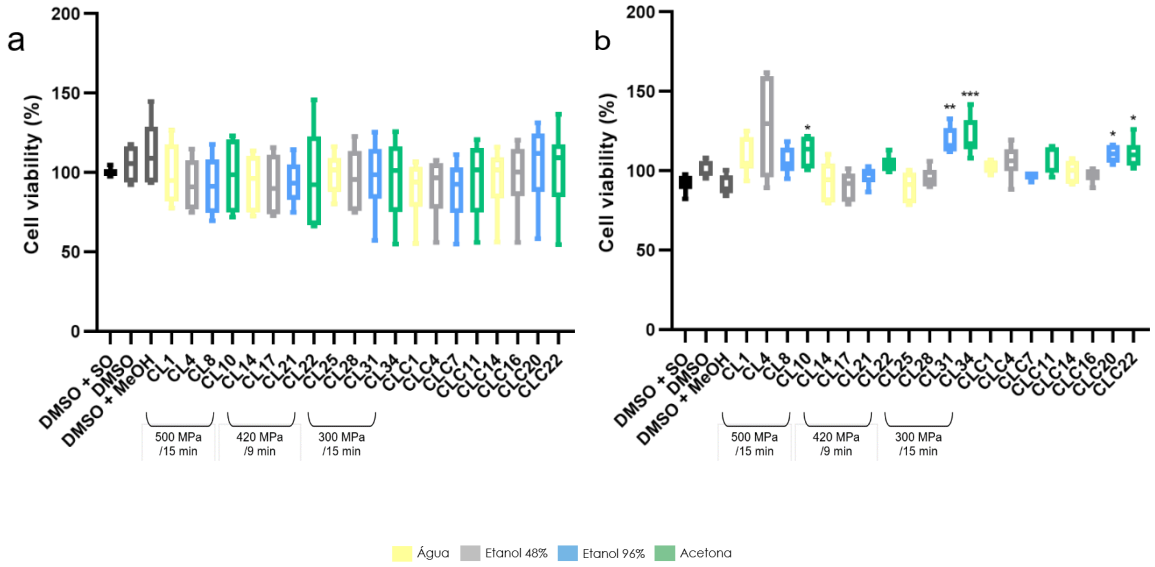

*Figura 10 - Ensaio SRB para deteção da viabilidade celular da linha celular HepG2, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, com três réplicas para cada amostra (n total = 6). Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + SO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001.*

3.1.2. Amostras Universidade do Minho

As amostras da microalga *Chlorococcum* sp. extraídas por tratamento convencional e óhmico, foram analisados em relação à capacidade de redução de lípidos e prevenção da esteatose nas células HepG2 *fat-overloaded*. Os resultados obtidos foram comparados em relação ao controlo solvente (DMSO + SO) e expressos em % de conteúdo lipídico. Para a metodologia mais adequada, *imaging*, dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, com três réplicas para cada amostra (n total = 6). Em ambas as concentrações usadas (Figura 11), 10 µg/mL e 25 µg/mL, nenhuma amostra provocou uma alteração significativa na redução da percentagem lipídica nas células, em relação ao controlo solvente, DMSO (100%). Relativamente à citotoxicidade das células HepG2 nas concentrações testadas (Figura 11), 10 µg/mL e 25 µg/mL, nenhuma amostra provocou efeitos considerados estatisticamente significativos na viabilidade das células.

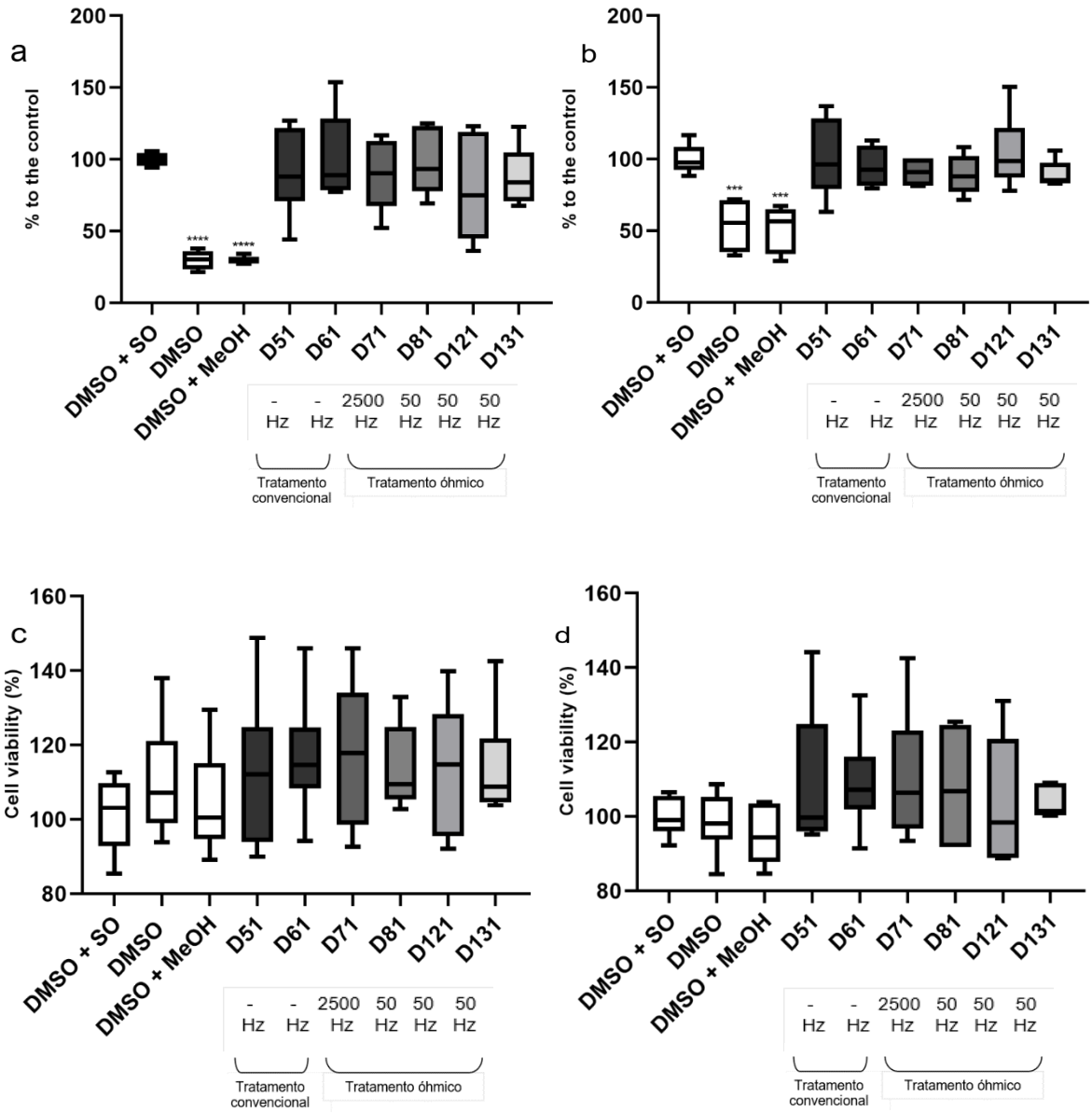

*Figura 11 - Atividade anti-esteatose de extratos da microalga Chlorococcum sp., extraídos por tratamento convencional e óhmico, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Ensaio SRB para deteção da viabilidade celular da linha celular HepG2, c) concentração final de 10 µg/mL e d) concentração final de 25 µg/mL. Dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, com três réplicas para cada amostra (n total = 6). Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + SO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001.*

3.2. Ensaio anti-inflamação na linha celular RAW264.7

3.2.1. Amostras Universidade de Aveiro

As amostras da microalga *Chlorococcum* sp. fornecidos pela Universidade de Aveiro, extraídos por HPP, foram analisados em relação à capacidade de reduzirem a inflamação induzida nas células, efeito anti-inflamatório. Assim, os presentes resultados, representados como % de NO, mostram apenas dados de células ativadas por LPS, à exceção do controlo negativo, no qual as células foram apenas expostas ao DMSO. Dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, 10 µg/mL e 25 µg/mL, com quatro réplicas para cada amostra (n total = 8).

No que se refere à concentração final de 10 µg/mL (Figura 12a), verificou-se que 3 das 20 amostras testadas apresentaram resultados estatisticamente significativos, reduziram em média o teor de NO em comparação com o controlo solvente (100%). Assim, as amostras CL21 e CL31 extraídas com o solvente etanol 96%, com as condições 420 MPa/9 min e 300 MPa/15 min, respetivamente, reduziram em 40% a resposta inflamatória. A amostra CL34, extraída com o solvente acetona, 300 MPa/15 min, reduziu a quantidade de NO também em 40%.

Na concentração final de 25 µg/mL, 15 de 20 amostras promoveram uma redução estatisticamente significativa da percentagem de NO presente nas células (Figura 12b). Destaca-se as amostras extraídas com acetona, uma vez que todas as amostras extraídas com este solvente, independentemente das restantes condições, demostraram resultados significativos, com um redução mínima de 40%, CL10, e uma redução máxima de 60%, CL8. O mesmo se sucedeu com as amostras extraídas com o solvente etanol 48%, dado que todas as amostras apresentaram resultados significativos, com reduções na média dos 40%. Estes resultados levam a assumir que todas as amostras extraídas com estes dois solventes apresentam compostos bioativos, possibilitando a sua utilização em futuros tratamentos anti-inflamatórios. Embora as amostras extraídas com o solvente acetona apresentassem uma maior percentagem de redução da quantidade de NO presentes nas células.

Por outro lado, apenas uma amostra extraída com o solvente água, CL1 (500 MPa/15 min), reduziu o teor de NO em 20%, comparando com o controlo solvente (100%). Por último, apenas 3 amostras extraídas com o solvente etanol 96%, demonstram capacidade de redução de NO nos macrófagos. Destacando-se a amostra CL21 (420 MPa/9 min) e CL31 (300 MPa/15 min), com uma redução de 60%, redução quase total da inflamação das células comparativamente com o controlo negativo (DMSO). E a amostra controlo CLC20 com uma redução de 50%. O facto de ter existido

um grande número de amostras com resultados estatisticamente significativos, torna difícil a conclusão sobre a tendência das condições de extração mais adequadas. Verificou-se que todas as metodologias de extração permitiram a extração de compostos bioativos da microalga *Chlorococcum* sp..

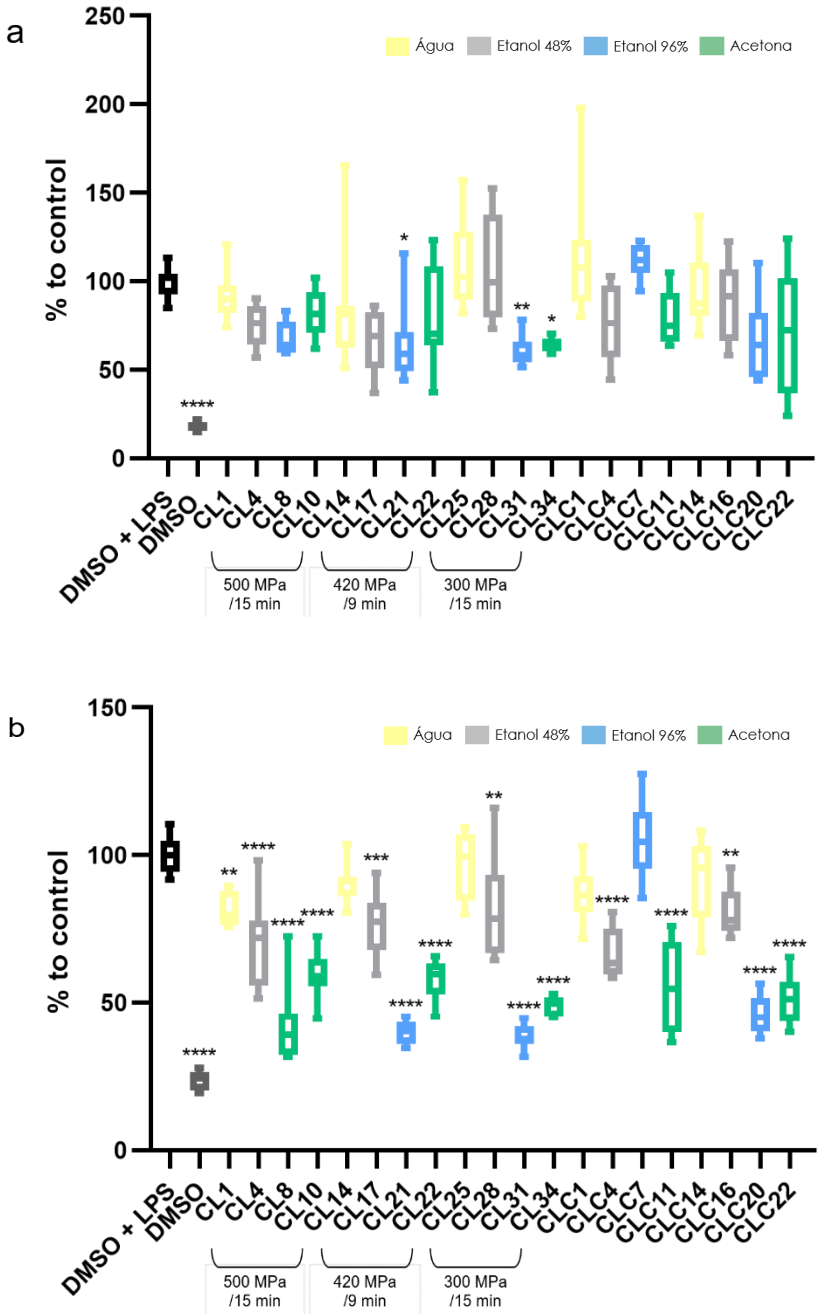

*Figura 12 - Atividade anti-inflamatória de extratos da microalga Chlorococcum sp., extraídos por alta pressão hidrostática, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + LPS (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.*

Por outro lado, o efeito pro-inflamatório, verificação da reação basal das células aos extratos, também foi estudado. Dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, com quatro réplicas para cada amostra (n total = 8). Os seguintes resultados, representados como % de NO, apresentam apenas dados de células não ativadas por LPS. Desta forma, em ambas as concentrações usadas (Figura 13), 10 µg/mL e 25 µg/mL, as amostras extraídas pelo solvente etanol 48%, CL17 (420 MPa/9 min), CL28 (300 MPa/15 min) e a amostra controlo CLC4, provocaram um aumento significativo da percentagem de NO nas células, em relação ao controlo solvente (DMSO). Assim, estas amostras são descartadas para a atividade anti-inflamatória acima referida.

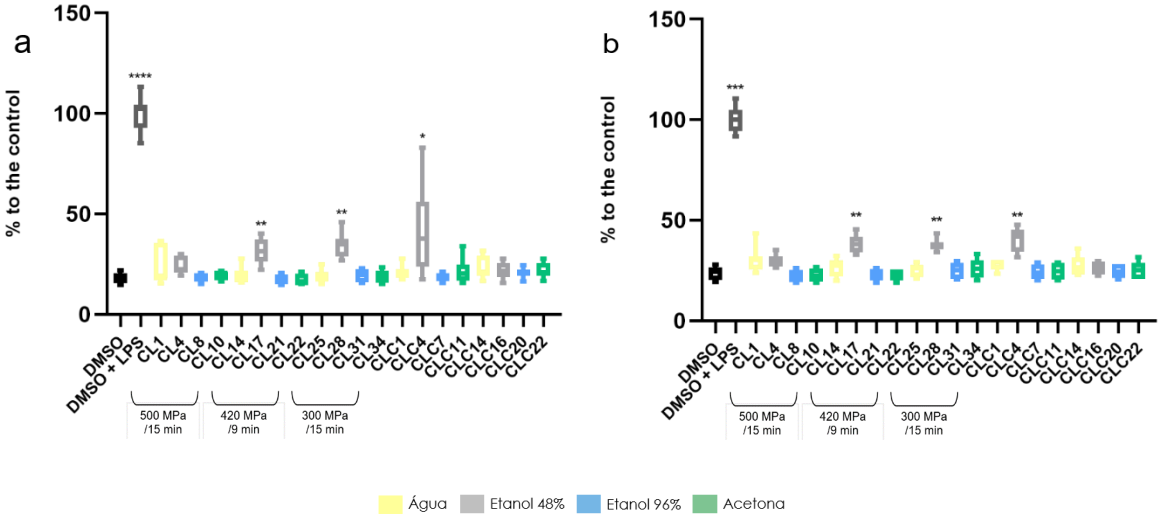

*Figura 13 - Atividade pro-inflamatória de extratos da microalga Chlorococcum sp., extraídos por alta pressão hidrostática, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente (DMSO). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001.*

No que se refere à citotoxicidade das células RAW 264.7 nas concentrações testadas (Figura 14), 10 µg/mL e 25 µg/mL, nenhuma amostra provocou efeitos considerados estatisticamente significativos na viabilidade das células.

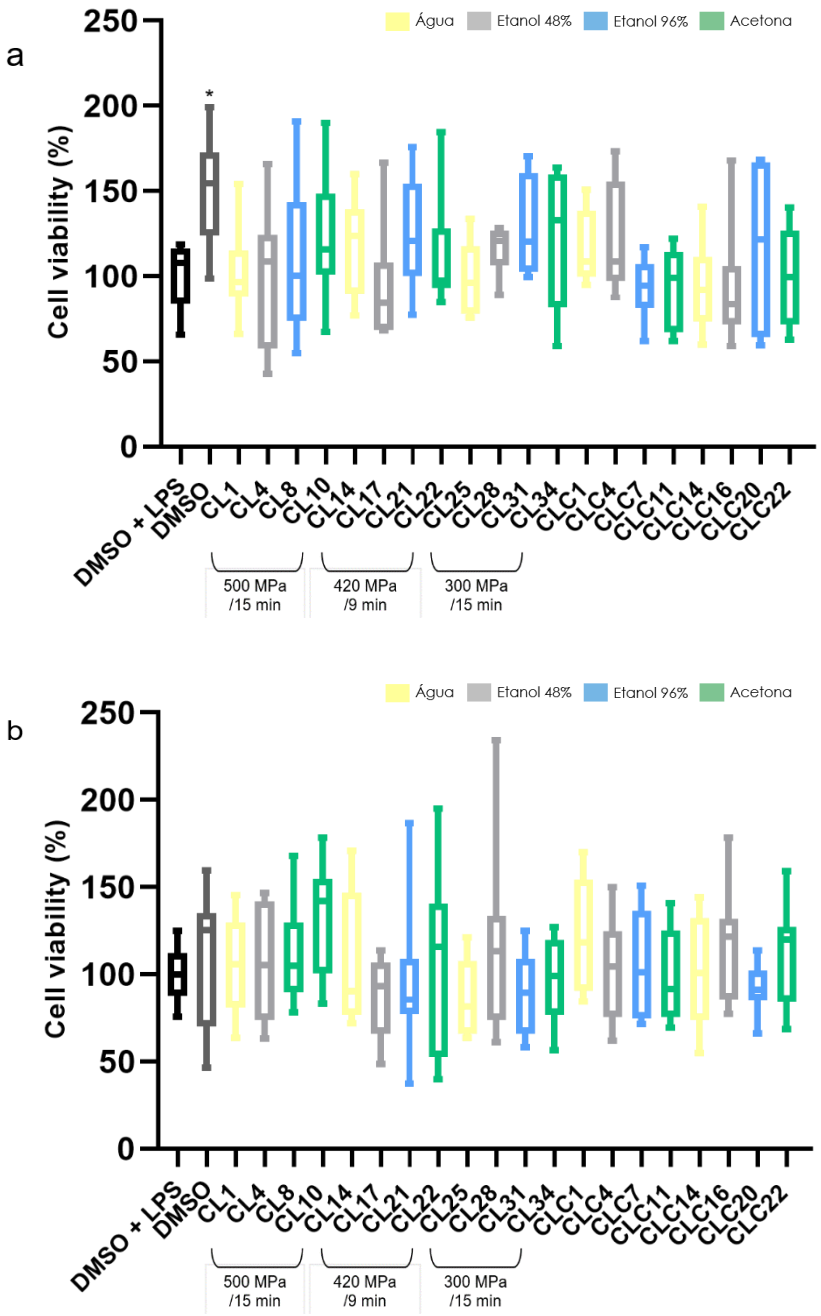

*Figura 14 - Ensaio MTT para deteção da viabilidade celular dos macrófagos RAW264.7, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, com quatro réplicas para cada amostra (n total = 8). Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + LPS (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001.*

3.2.2. Amostras Universidade do Minho

As amostras da microalga *Chlorococcum* sp. extraídas por tratamento convencional e óhmico, foram analisados com a finalidade de estudar à capacidade de reduzirem a inflamação induzida nas células, efeito anti-inflamatório. Os seguintes resultados, representados como % de NO, mostram apenas dados de células ativadas por LPS, à exceção do controlo negativo, no qual as células foram apenas expostas ao DMSO. Dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, com quatro réplicas para cada amostra (n total = 8).

Na concentração final de 10 µg/mL (Figura 15a), as amostras D61 (tratamento convencional), D121 e D131 (tratamento óhmico) reduziram em 10-20% o NO presente nas células, relativamente ao controlo solvente (100%). Todos as amostras testadas na concentração de 25 µg/mL (Figura 15b), em especial D61, D121 e D131, não seguiram a tendência anterior de redução da percentagem de NO, ou seja, não apresentaram resultados estatisticamente significativos. A atividade anti-inflamatória das amostras da microalga ao ser apenas expressiva na concentração final de 10 µg/mL torna os resultados pouco confiáveis.

No estudo do efeito pro-inflamatório, verificação da reação basal das células aos extratos, dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, com quatro réplicas para cada amostra (n total = 8). Em ambas as concentrações usadas (Figura 15), 10 µg/mL e 25 µg/mL, nenhuma amostra provocou uma alteração significativa da percentagem de NO nas células, em relação ao controlo solvente (DMSO). Os seguintes resultados, representados como % de NO, apresentam apenas dados de células não ativadas por LPS.

Em relação à citotoxicidade das células RAW264.7 nas concentrações testadas (Figura 16), 10 µg/mL e 25 µg/mL, nenhuma amostra reduziu significativamente a viabilidade das células. Na concentração final de 10 µg/mL as amostras extraídas por tratamento óhmico, D81, D121 e D131, aumentaram ligeiramente a viabilidade celular. Na concentração final de 25 µg/mL apenas as amostras D121 e D131 seguiram a tendência referida, aumento da viabilidade celular.

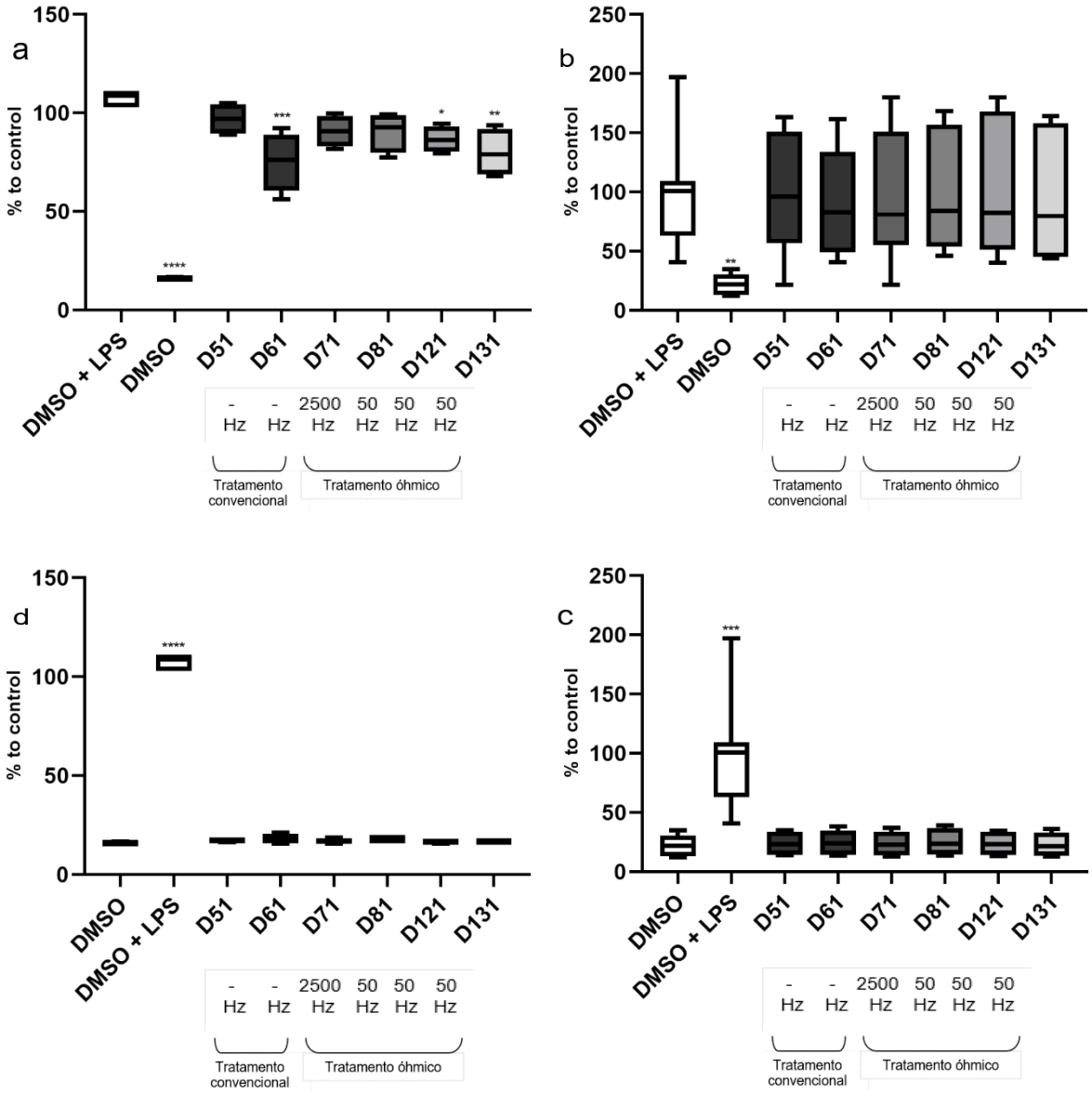

*Figura 15 - Atividade anti-inflamatória de extratos da microalga Chlorococcum sp., extraídos por tratamento convencional e óhmico, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Atividade pro-inflamatória de extratos da microalga Chlorococcum sp., extraídos por tratamento convencional e óhmico, c) concentração final de 10 µg/mL e d) concentração final de 25 µg/mL. Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + LPS (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.*

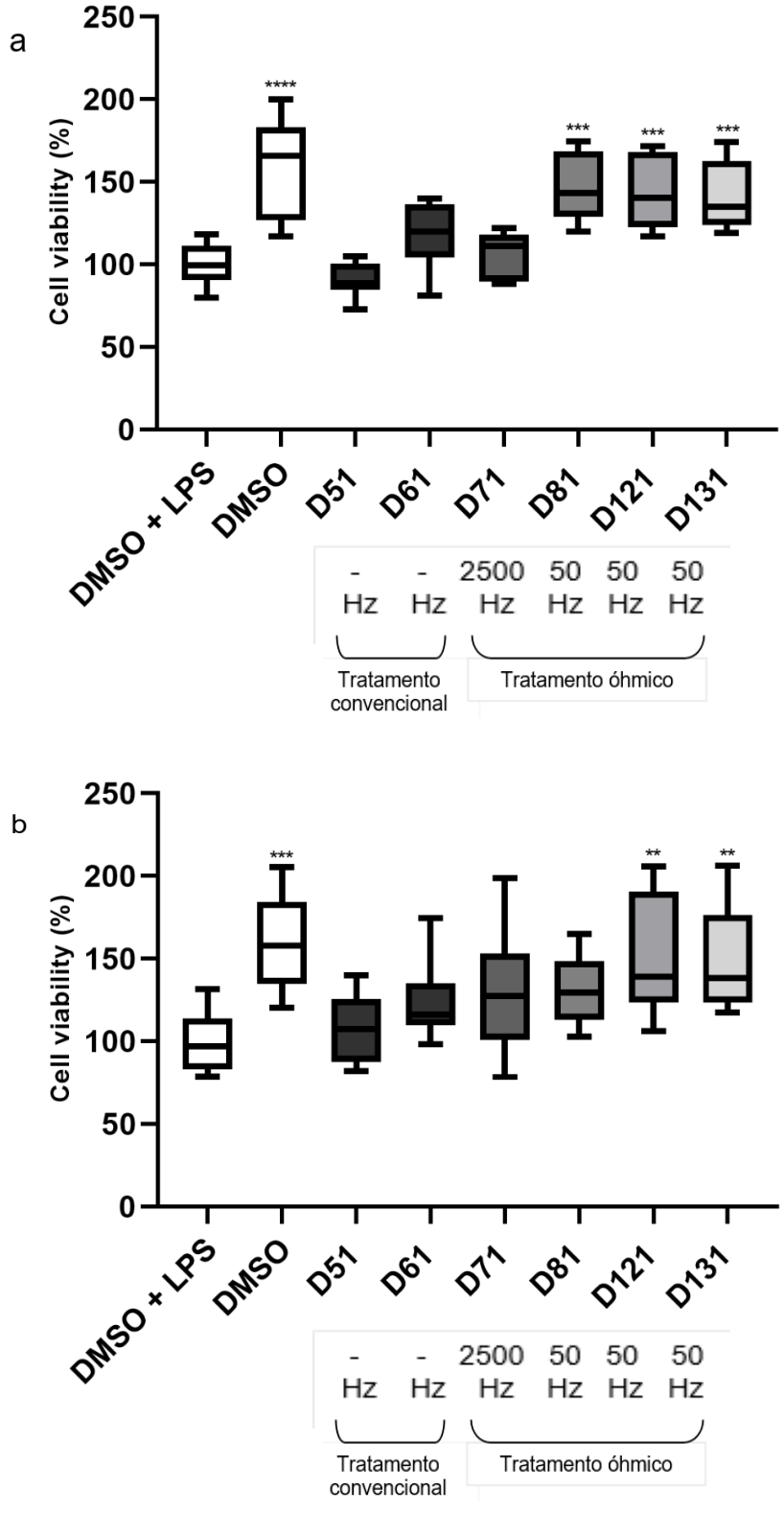

*Figura 16 - Ensaio MTT para deteção da viabilidade celular dos macrófagos RAW264.7, a) concentração final de 10 µg/mL e b) concentração final de 25 µg/mL. Dois ensaios independentes foram realizados para cada concentração, com quatro réplicas para cada amostra (n total = 8). Os dados foram normalizados em relação ao controlo solvente, DMSO + LPS (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.*

3.3. Screening de extratos da microalga *Chlorococcum* sp. com potencial atividade anti-obesidade em larvas de peixe-zebra

Todos os resultados obtidos foram comparados em relação ao controlo DMSO e expressos em % de intensidade de fluorescência. O controlo DMSO deve expressar uma percentagem de 100% de intensidade de fluorescência, sem atividade. Por outro lado, para validar cada ensaio realizado, o composto REV (controlo positivo) foi usado, esperando-se uma percentagem de intensidade de flurescência nula, dado as suas propriedades de anti-obesidade (Öztürk et al., 2017). A concentração dos extratos testados foi de 10 µg/mL. Três ensaios independentes foram realizados, com 6 a 8 larvas para cada amostra (n total = 18 a 24).

3.3.1. Amostras Universidade de Aveiro

Um total de 19 amostras da microalga *Chlorococcum* sp., extraídas por HPP, foram analisadas com vista a observar a possível capacidade redutora do conteúdo lipídico, presente no intestino/saco vitelino de larvas de peixe-zebra. Verificou-se uma variabilidade nos resultados, como demostra a Figura 17, devido aos elevados desvios padrão de algumas amostras. No entanto, 11 amostras demonstraram resultados estatisticamente significativos.

No que diz respeito às amostras extraídas com o solvente água, constatou-se que aquelas que no processo de extração foram expostas a uma intensidade de pressão de 420 MPa, 300 MPa ou nula (representando os controlos) conseguiram reduzir o conteúdo lipídico nas larvas. Deste modo destaca-se as amostras CL14 (420 MPa/9 min) e CL25 (300 MPa/15 min), ambas reduziram 70% a intensidade de fluorescência, e CLC1 (sem pressão administrada/15 min). Em relação as amostras extraídas com o solvente etanol 48%, apenas se observou resultados significativos nos controlos, ou seja, amostras que não foram submetidas a intensidade de pressão durante a extração previamente realizada. Assim, salienta-se a amostra CLC4 (tempo de contacto entre a biomassa e o solvente, 15 minutos) e CLC16 (tempo de contacto entre a biomassa e o solvente, 9 minutos). O contrário ocorreu nas amostras extraídas com o solvente etanol 96%, dado que apenas as amostras que foram sujeitas a intensidade de pressão, como a amostra CL8 (500 MPa/15 min), reduzindo 80% a intensidade de fluorescência, CL21 (420 MPa/9 min) e CL31 (300 MPa/15 min), demonstraram resultados significativos, isto é, redução da intensidade de fluorescência nas larvas de peixe-zebra. Por fim, verificou-se que as amostras extraídas com o solvente acetona, CL22 (420 MPa/9 min), com uma redução da intensidade de flurescência de 70%, CL11 (sem pressão administrada/15 min) e CLC22 (sem pressão administrada/9 min), foram as únicas a demostram efeitos significativos. É importante salientar que esta amostra (CL22) demonstrou resultados positivos para a

atividade de redução do conteúdo lipídico em ambos os modelos testados, in vitro e in vivo. Futuramente, seria interessante efetuar mais pesquisas com esta amostra para entender quais os compostos bioativos presentes que resultam nesta atividade em específico.

Desta forma, neste estudo destaca-se a amostra CL8 (etanol 96%; 500 MPa/15 min) e CL25 (água; 300 MPa/15 min) com uma redução média da intensidade de fluorescência de 80% e 70%, respetivamente, em relação ao controlo DMSO (100%). O efeito da redução da fluorescência do extrato CL8, sendo a amostra mais ativa de todas as testadas, pode ser observado na Figura 18.

É de referir o uso de 19 amostras da microalga *Chlorococcum* sp., extraídas por HPP, em vez de um total de 20 amostras, visto que a amostra CLC7 não constatou neste estudo, por falta de extrato disponível.

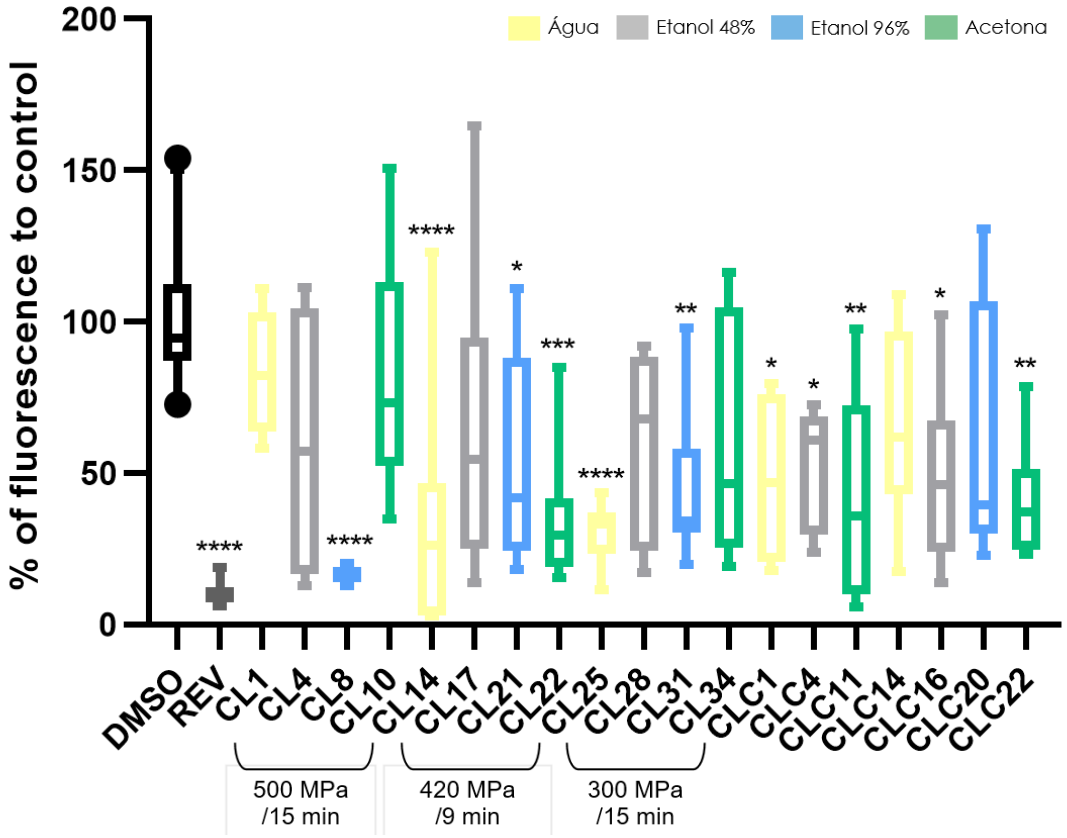

*Figura 17 - Atividade de redução lipídica de extratos da microalga Chlorococcum sp., extraídos por alta pressão hidrostática, em larvas de peixe-zebra. Os dados foram normalizados em relação ao controlo DMSO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001.*

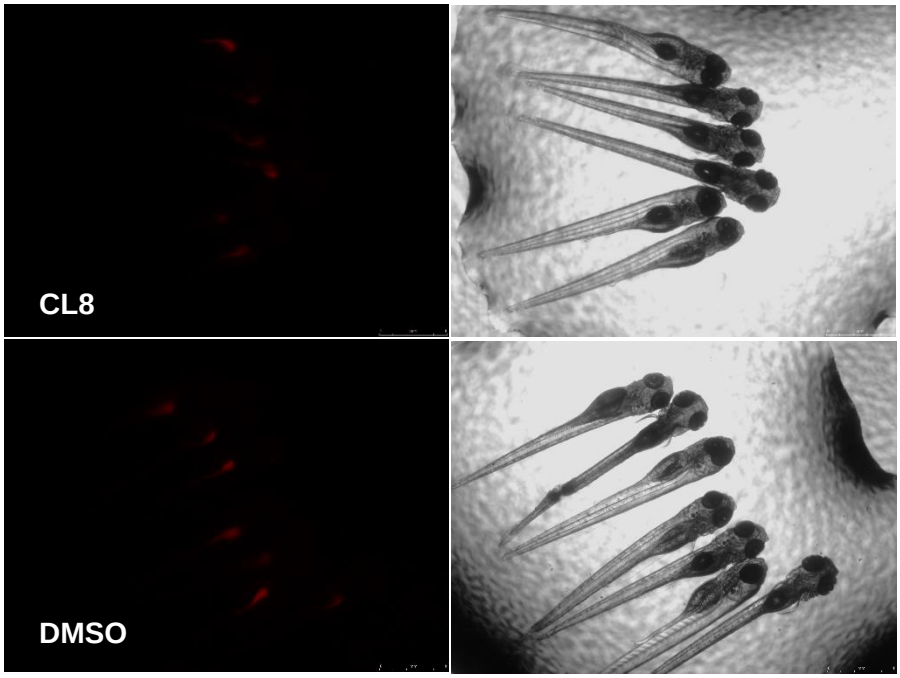

Figura 18 - Representação das imagens correspondestes ao extrato CL8 (parte superior) e ao controlo DMSO (parte inferior). Imagens obtidas no microscópio de flurescência (lado esquerdo), retiradas do terceiro ensaio independente.

3.3.2. Amostras Universidade do Minho

Relativamente às amostras fornecidas pela Universidade do Minho, um total de 6 amostras, as mesmas foram analisadas no que se refere à capacidade redutora do conteúdo lipídico, presente no intestino/saco vitelino de larvas de peixe-zebra. Verificou-se uma variabilidade nos resultados, como demostra a Figura 19, devido aos elevados desvios padrão de algumas amostras.

Em relação às amostras da microalga *Chlorococcum* sp. extraídas por tratamento convencional, D51 e D61, apenas a amostra D61 se apresentou ativa, com um resultado estatisticamente significativo, reduzindo 50% a intensidade de fluorescência. Esta amostra não foi submetida a nenhum tipo de frequência de campo elétrico, apenas foi sujeita a um tratamento de 15 minutos com etanol 70%, como solvente de extração, a uma temperatura de 50 ºC. Por outro lado, as amostras extraídas por tratamento óhmico, um total de 4 amostras, apenas duas, D81 e D121, apresentaram uma redução da média da intensidade de fluorescência de 50%, em relação ao controlo DMSO (100%). Ambas as amostras foram submetidas a um tratamento com frequência de campo elétrico de 50 Hz, etanol a 70% (solvente de extração), e temperatura de 50 ºC. Apenas o tempo de tratamento distingue as duas amostras, 15 minutos e 30 minutos, respetivamente. O efeito da redução da fluorescência do extrato D121 pode ser observado na Figura 20.

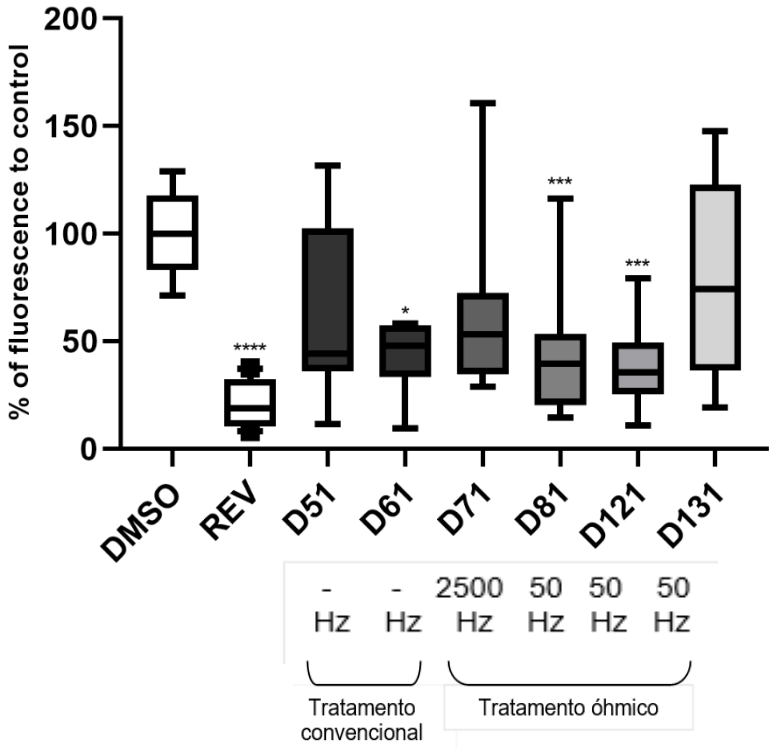

*Figura 19 - Atividade de redução lipídica de extratos da microalga Chlorococcum sp., extraídos por tratamento convencional e óhmico, em larvas de peixe-zebra. Os dados foram normalizados em relação ao controlo DMSO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ e **** $p < 0.0001$.*

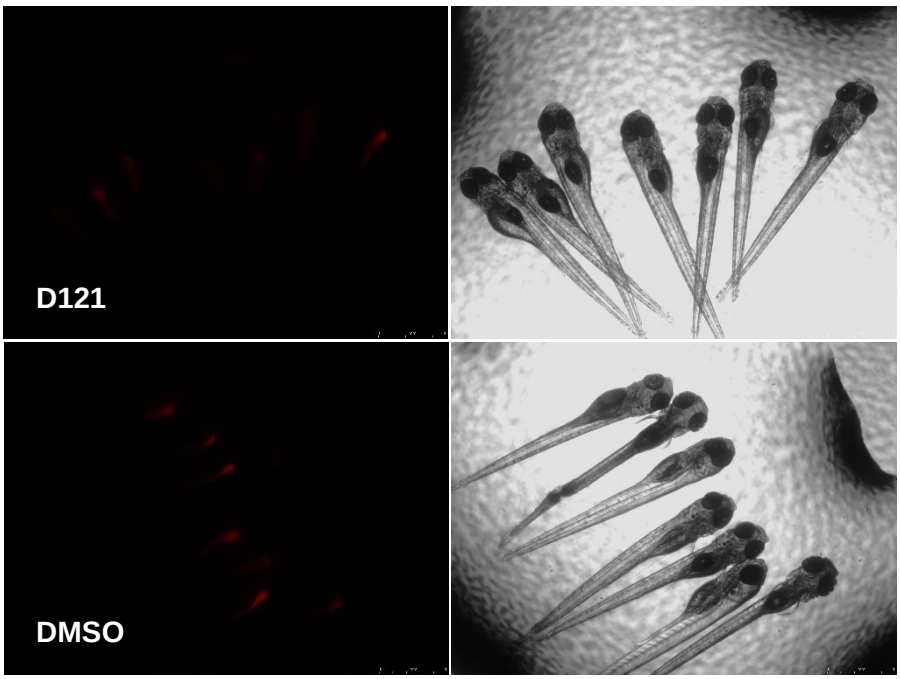

Figura 20 - Representação das imagens correspondestes ao extrato D121 (parte superior) e ao controlo DMSO (parte inferior). Imagens obtidas no microscópio de flurescência (lado esquerdo), retiradas do segundo ensaio independente.

3.4. Screening de extratos da microalga *Chlorococcum* sp. com potencial atividade anti-diabetes em larvas de peixe-zebra

Os resultados obtidos foram comparados com o controlo DMSO e expressos em % de intensidade de fluorescência, representando a percentagem de *uptake* de 2-NBDG, um análogo da glucose. O controlo DMSO deve expressar uma percentagem de 100% de intensidade de fluorescência. Por outro lado, para verificar a veracidade de cada ensaio o composto EMODIN (controlo positivo) foi utilizado, esperando-se uma elevada percentagem de intensidade de flurescência, visto que possui propriedades que contribuem para a manutenção do metabolismo de glicose no tecido adiposo, melhorando a tolerância à glicose e aumentando a sensibilização à insulina (X. Zhang et al., 2015). A concentração dos extratos testados foi de 10 µg/mL. Dois ensaios independentes foram realizados, com 5 larvas para cada amostra (n total = 15).

3.4.1. Amostras Universidade de Aveiro

Amostras extraídas por HPP, um total de 19, foram estudadas com o intuito de verificar a capacidade de aumentarem o processo de *uptake* de glucose em larvas de peixe-zebra. Os ensaios realizados incidiram no saco vitelino e no olho das larvas. Salienta-se o uso de 19 amostras da microalga *Chlorococcum* sp., extraídas por HPP, em vez de um total de 20 amostras, visto que a amostra CLC7 não constatou neste estudo, por falta de extrato disponível. No que se refere ao *uptake* de glucose no saco vitelino das larvas de peixe-zebra, nenhuma amostra apresentou um resultado estatisticamente significativo (Figura 21). No entanto, foi possível observar o contraste entre a intensidade de fluorescência entre o controlo DMSO e o controlo positivo, EMODIN (Figura 22).

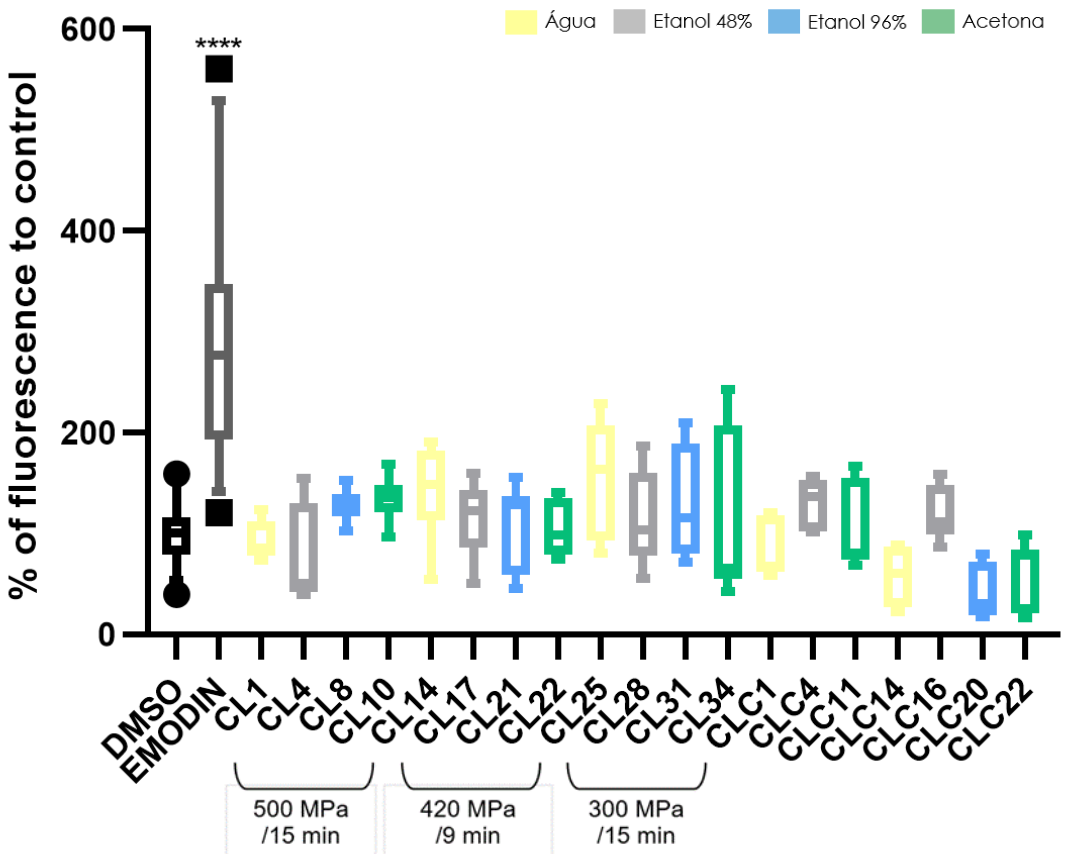

*Figura 21 - Atividade anti-diabetes de extratos da microalga Chlorococcum sp., extraídos por alta pressão hidrostática, no saco vitelino de larvas de peixe-zebra. Os dados foram normalizados em relação ao controlo DMSO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001.*

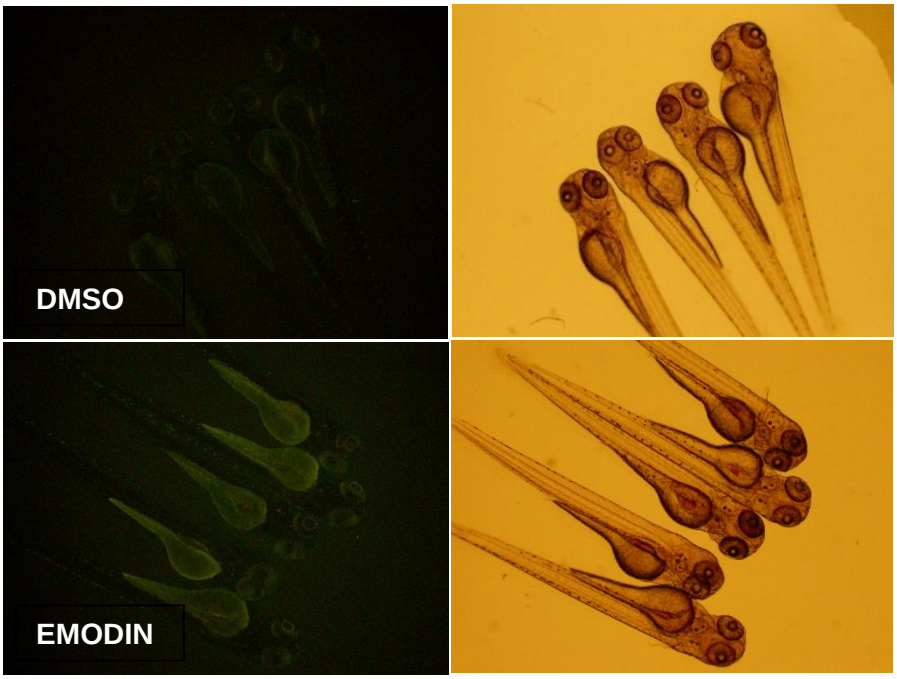

Figura 22 - Representação das imagens correspondestes ao controlo DMSO (parte superior) e ao controlo EMODIN (parte inferior). Imagens obtidas no microscópio de flurescência (lado esquerdo), retiradas do terceiro ensaio independente.

Em contrapartida, relativamente ao *uptake* de glucose no olho das larvas de peixe-zebra, apenas duas amostras apresentaram atividade, demostrando resultados estatisticamente significativos (Figura 23). Evidencia-se as amostras extraídas com o solvente água, CL14 e CL25, aumentando mais de 100% a intensidade de fluorescência em comparação com o controlo DMSO. A amostra CL14, com maior atividade, foi extraída com uma intensidade de pressão de 420 MPa, durante 9 minutos. Já a amostra CL25, foi extraída com uma intensidade de pressão de 300 MPa, durante 15 minutos.

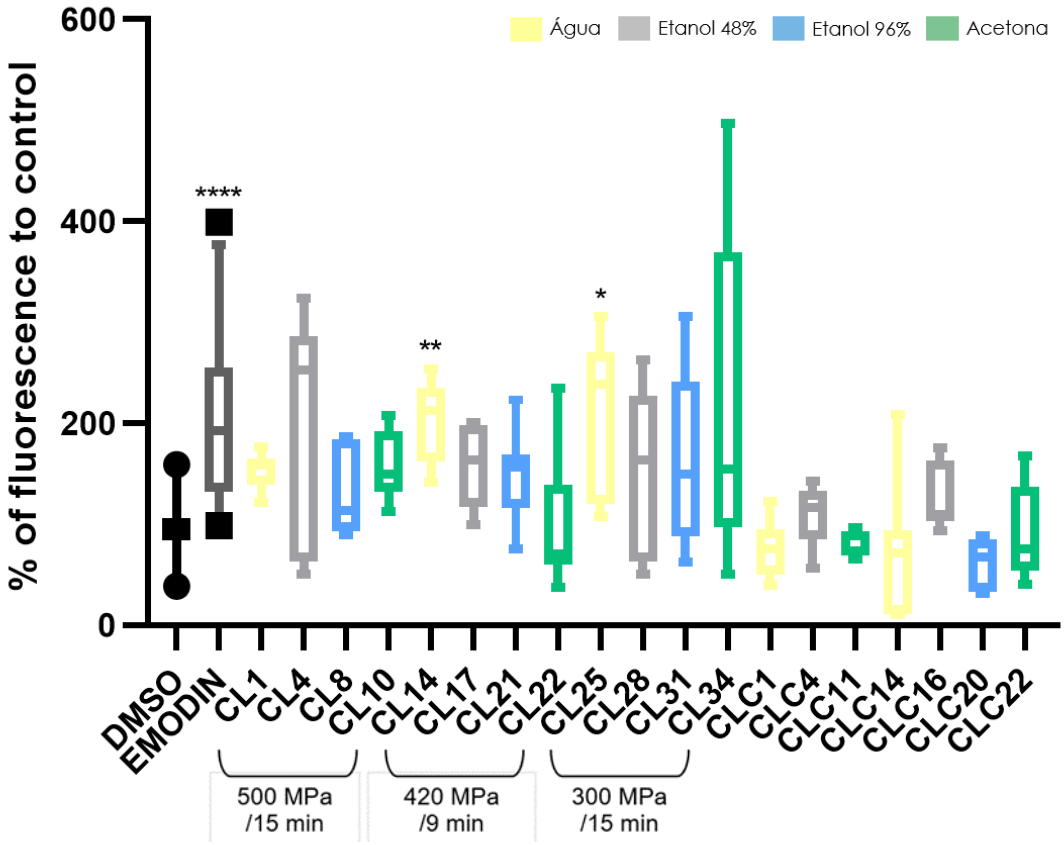

*Figura 23 - Atividade anti-diabetes de extratos da microalga Chlorococcum sp., extraídos por alta pressão hidrostática, no olho de larvas de peixe-zebra. Os dados foram normalizados em relação ao controlo DMSO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001.*

3.4.2. Amostras Universidade do Minho

As amostras fornecidas pela Universidade do Minho, um total de 6 amostras, foram também analisadas com o objetivo de verificar a capacidade de aumentarem o processo de *uptake* de glucose em larvas de peixe-zebra. Os ensaios realizados incidiram no saco vitelino (Figura 24a) e no olho das larvas (Figura 24b). As amostras extraídas por tratamento convencional, D51 e D61, não apresentaram atividade em ambos os ensaios efetuados, isto é, nenhuma demostrou resultados estatisticamente significativos. O mesmo se verificou com as amostras extraídas por tratamento óhmico. Já que nenhuma apresentou resultados estatisticamente significativos, no que se refere ao *uptake* de glucose no saco vitelino e no olho das larvas de peixe-zebra.

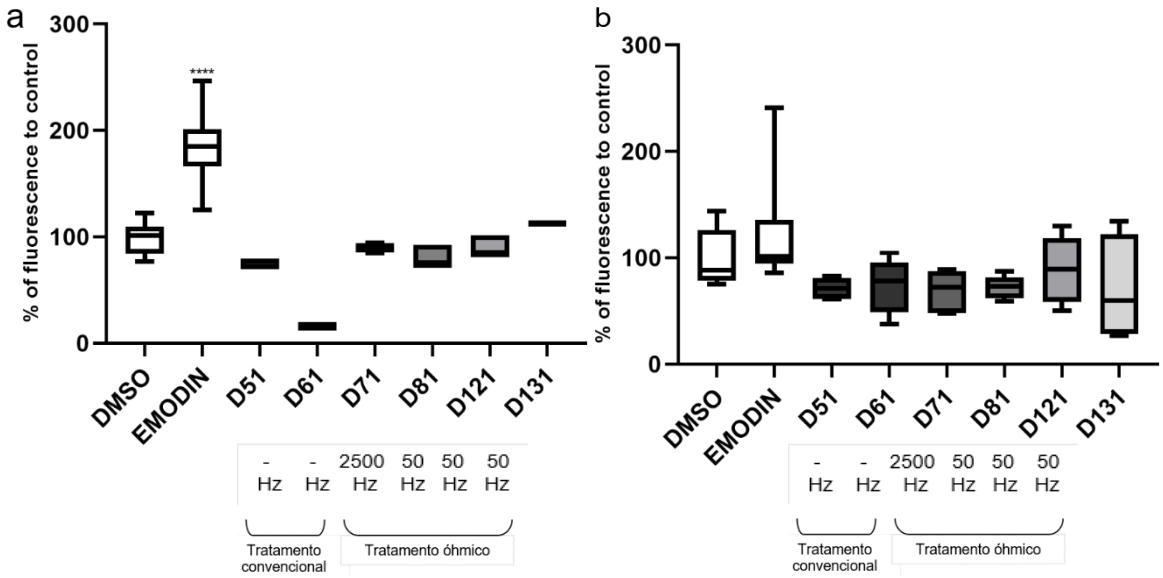

*Figura 24 - Atividade anti-diabetes de extratos da microalga Chlorococcum sp., extraídos por tratamento convencional e óhmico, no olho (a) e saco vitelino (b) de larvas de peixe-zebra. Os dados foram normalizados em relação ao controlo DMSO (100%). Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001.*

3.5. Western Blot

A intensidade das bandas de proteína foi quantificada através de um *plug-in* adaptado no software Image J. As bandas de proteína do anticorpo β-actina serviram de comparação, designando-se como controlo, para cada ensaio realizado. Salienta-se a seleção de duas amostras da microalga *Chlorococcum* sp., com maior atividade no ensaio anti-esteatose, metodologia *imaging* na concentração final de 25 µg/mL, consideradas assim amostras ativas, CL10 e CL22, ambas extraídas por HPP, para a realização desta técnica. Na Figura 25 estão representados os resultados referentes aos anticorpos estudados através dos Western Blot realizados previamente. É possível observar que dos 6 anticorpos testados, CEBPα (a), ACACα (b), PRKA-β1 (c), PPAR γ (d), ACACα fosforilado (e) e PRKA-β1 fosforilado (f), apenas o CEBPα (a) demostrou resultados estatisticamente significativos. Em comparação com o controlo, no qual as células HepG2 foram expostas apenas com DMSO, a amostra CL22, extraída por HPP (solvente acetona; 420 MPa/9 min), alterou a expressão das proteínas, ocorrendo uma diminuição na expressão, como é possível observar na Figura 26.

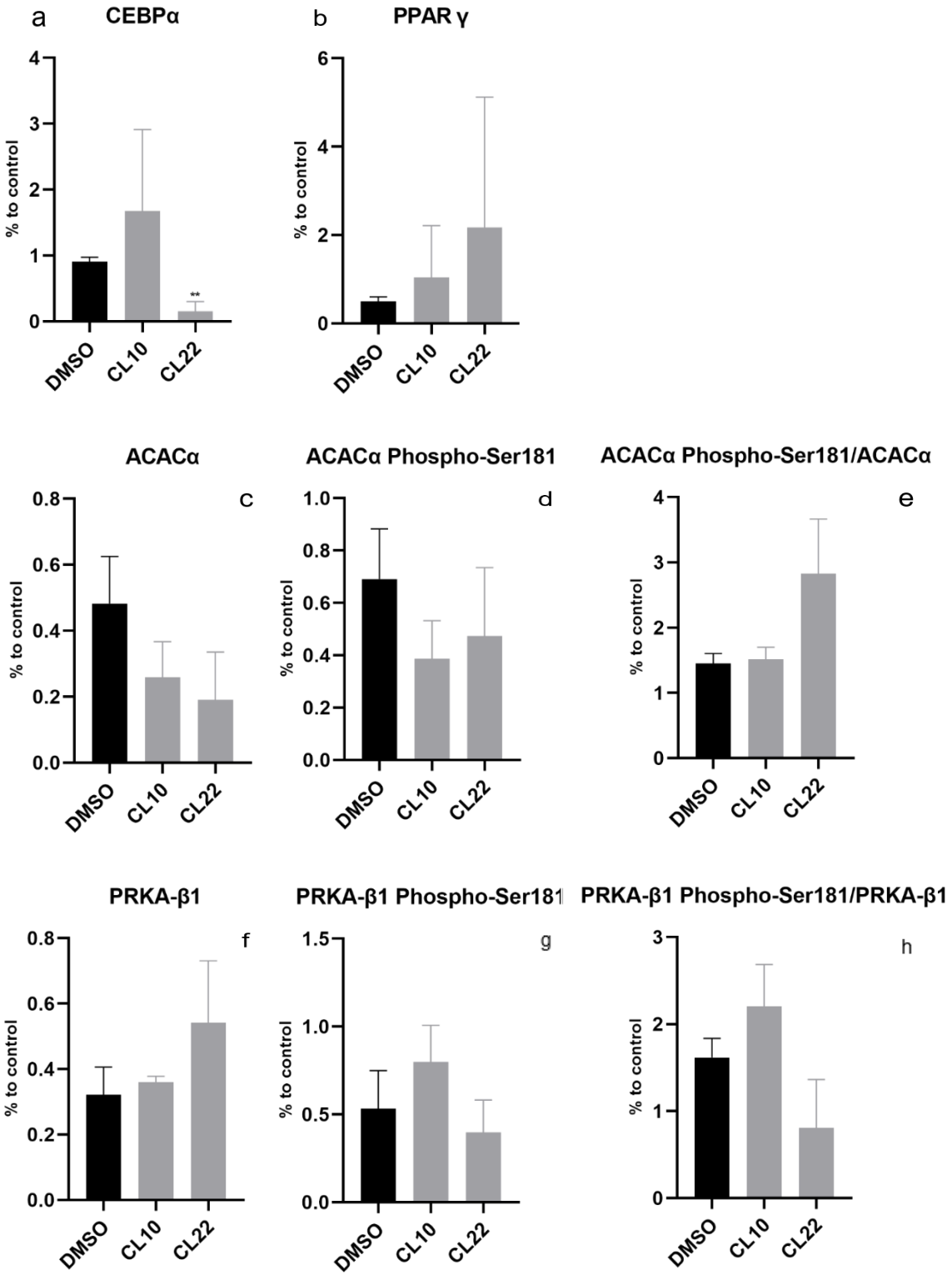

*Figura 25 - Expressão de CEBPα (a), PPAR γ (b), ACACα (c), ACACα fosforilado (d), rácio entre ACACα fosforilado e ACACα (e), PRKA-β1 (f), PRKA-β1 fosforilado (g) e rácio entre PRKA-β1 fosforilado e PRKA-β1 (h) em células HepG2. Um ensaio foi realizado para a concentração final de 25 µg/mL, com três réplicas para cada amostra (n total = 3). Os dados foram normalizados em relação ao controlo DMSO. Os resultados estatisticamente significativos estão indicados com o símbolo * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 e **** p < 0.0001.*

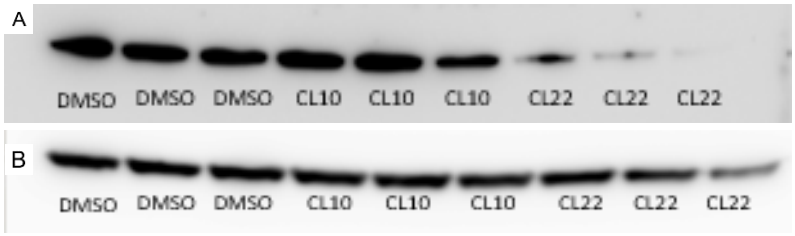

Figura 26 - Comparação da expressão das bandas de proteína entre o anticorpo CEBPα (A) e β-actina (B).

3.6. Perfil metabólico

3.6.1. Molecular *networking* e análise metabolómica

As amostras extraídas com o solvente acetona, com atividade e sem atividade no ensaio anti-esteatose na linha celular HepG2, da Universidade de Aveiro foram selecionadas como grupos independentes e identificadas com um *color code* na plataforma GNPS, com resultado num molecular *networking* que permitiu a comparação dos metabólitos presentes nas amostras ativas e não ativas, Figura 27. Grupo 1 amostra ativa CL10 (amarelo), Grupo 2 amostra ativa CL22 (azul-claro), Grupo 3 amostra não ativa CL34 (azul-escuro), Grupo 4 amostra não ativa CLC11 (verde) e Grupo 4 amostra não ativa CLC22 (rosa). Apenas foram considerados relevantes os *nodes* que apresentavam as cores amarelo e/ou azul-claro, amostras ativas CL10 e CL22, respetivamente. No total 40 metabólitos (*nodes*) presentes em clusters únicos de amostras ativas foram identificados (Tabela 4). Entre os quais 21 picos de massa (52.5%) foram identificados, através da comparação do *precursor mass* (M + H) nas bases de dados *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) e *Dictionary of Natural Products* (DNP). E os restantes 19 picos de massa (47.5%) não foram possíveis de serem identificados. Por outro lado, foram identificados no molecular *networking* 4 *clusters* distintos pelo software *MolNetEnhancer* (Figura 43), *Lipids and lipid-like molecules*, *Benzenoids*, *Organic oxygen compounds* e *Phenylpropanoids and polyketides*.

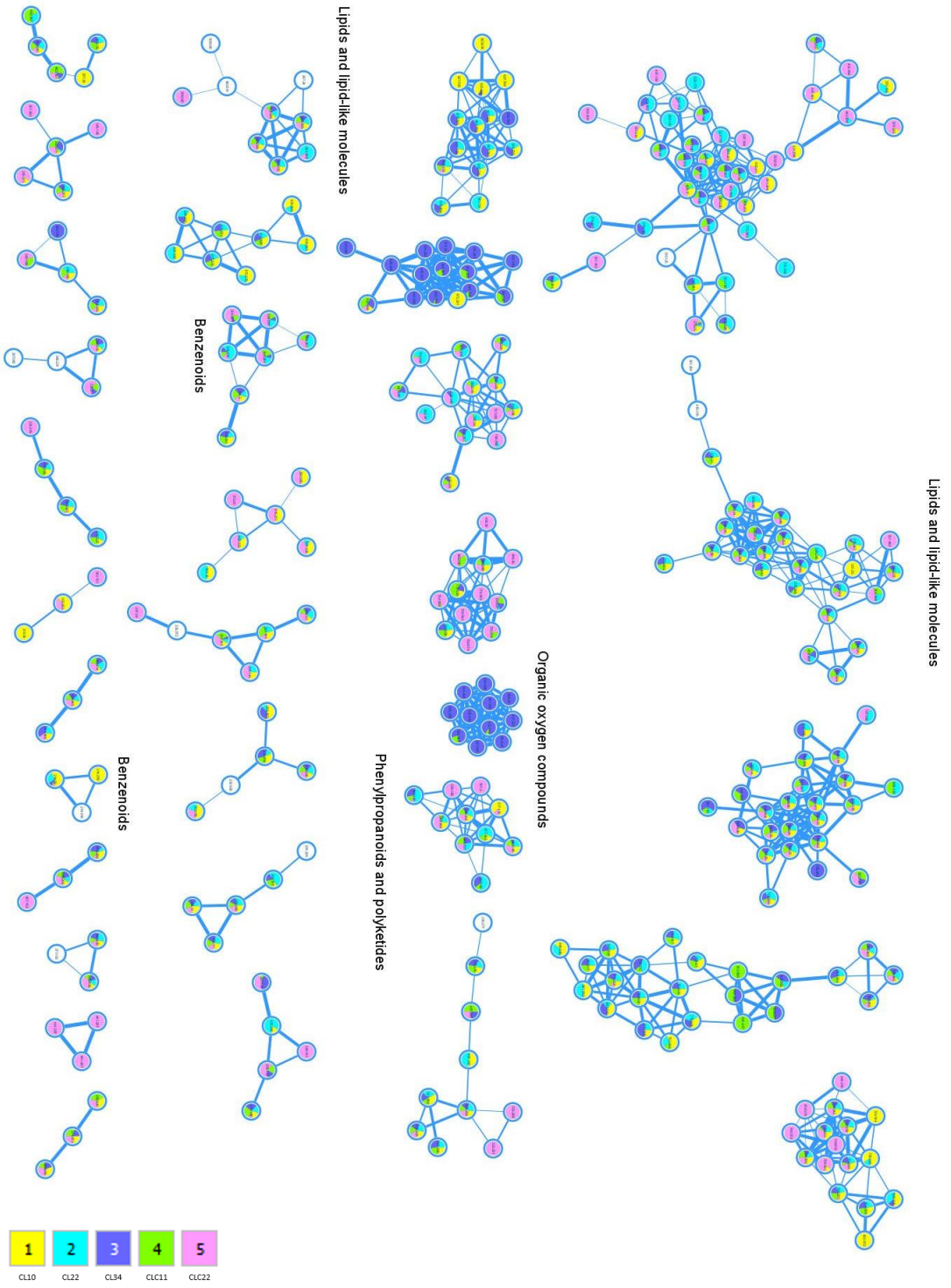

Figura 27 - Identificação dos principais clusters obtidos a partir do molecular networking de extratos HPP extraídos com o solvente acetona, Universidade de Aveiro, visualizado no Cytoscape. O molecular networking não se encontra completo, apenas clusters e grupos superiores a três nodes estão representados.

Tabela 4 - Identificação dos 40 picos de massa bioativos através das plataformas Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS) e Dictionary of Natural Products (DNP), correspondendo a diversos compostos. As identificações no GNPS são baseadas na fragmentação MS2, já o critério de pesquisa no DNP baseou-se no precursor mass do valor de m/z com uma variação de +/- 0.002. As identificações aceites basearam-se num ppm < 5.

Shared Peaks	MQ Score	M + H	RT	ppm	Putative identification	Formula	Source
-	-	455,138	425,8256316	0,91163	1,7-Bis(3,4-dihydroxyphenyl)-5-oxo-3-heptanesulfonic acid; 5'-Hydroxy, 3',3''-di-Me ether	$C_{21}H_{26}O_9S$	DNP
				0,911633723	1-Thioglucose; α-D-Pyranose-form, Benzyl glycoside, tetra-Ac	$C_{21}H_{26}O_9S$	DNP
				0,911633723	1-Thioglucose; β-D-Pyranose-form, Benzyl glycoside, tetra-Ac	$C_{21}H_{26}O_9S$	DNP
-	-	701,306	560,776	-	-	-	-
-	-	724,514	738,4841111	-	-	-	-
-	-	820,572	723,5565714	-	-	-	-
-	-	847,532	776,5315	-	-	-	-
-	-	351,250	673,8164737	-	-	-	-
-	-	355,188	464,2421111	-1,61499464	Glycerol 1-alkanoates; Glycerol 1-dodecanoate, 2-Phosphate	$C_{15}H_{31}O_7P$	DNP
				-1,61499464	Lysophosphatidic acids; Dodecanoyl	$C_{15}H_{31}O_7P$	DNP
-	-	849,548	780,9651818	-	-	-	-
-	-	529,175	412,1065714	-1,87629636	Antibiotic A 80915C; 4a-Dechloro, 4aξ-hydroxy **OR** CNQ525.528	$C_{26}H_{34}Cl_2O_7$	DNP
12	M+H	758,592	772,1689444	-	DGTSA(16:0/18:1); [M+H]+ C44H84NO7	$C_{44}H_{84}NO_7$	GNPS
-	-	921,751	886,0672609	-	-	-	-
-	-	475,321	313,4985246	-0,47436990	17,28-Dotriacontadiene-2,4,6,15,31-pentayne-1,8,30-triol	$C_{32}H_{42}O_3$	DNP
				-0,47436990	17,28-Dotriacontadiene-2,4,6,15,31-pentayne-1,8,30-triol; (8*S*,17*Z*,28*E*,30*R*)-form **OR** Triangulyne E	$C_{32}H_{42}O_3$	DNP
-	-	827,709	1017,575	-	-	-	-
-	-	487,287	611,5801765	1,694502761	3,4-Didehydro-9,14-diethyl-4,8,13,18-tetramethyl-3,21-propanophorbine; 1',21-Didehydro	$C_{33}H_{34}N_4$	DNP
-	-	823,678	950,8026	-	-	-	-
-	-	827,709	1018,33625	-	-	-	-
-	-	505,350	675,41204	-	-	-	-
11	M+H	873,579	888,05125	-	Pheophytin A	$C_{55}H_{74}N_4O_5$	GNPS
				-1,87917162	Bidenphytin B; 11-Deoxy **OR** Bidenphytin A	$C_{55}H_{74}N_4O_6$	DNP
-	-	887,567	874,056	-0,37222544	4,4'-Diapo-4,4'-carotenedioic acid; [9*Z*-Octadecenoyl-(--2)-β-D-glucopyranosyl] ester	$C_{54}H_{78}O_{10}$	DNP
				-0,37222544	4,4'-Diapo-4,4'-carotenedioic acid; [11*Z*-Octadecenoyl-(--2)-β-D-glucopyranosyl] ester	$C_{54}H_{78}O_{10}$	DNP
-	-	835,549	939,2125882	-	-	-	-
-	-	338,266	622,8659444	-	-	-	-
-	-	835,549	940,108	-	-	-	-
-	-	297,240	969,5345952	-	-	-	-
-	-	835,549	939,2125882	-2,24623574	12-Methyl-1-tridecylamine OR 12-Methyl-1-tridecanamine, CAS. 1-Amino-12-methyltridecane. Medelamine A. NK 148198A	$C_{14}H_{31}N$	DNP
-	-	214,253	439,3757	-2,24623574	1-Nonylamine; *N*-(3-Methylbutyl)-1-nonylamine OR *N*-(3-Methylbutyl)-1-nonylamine. N-Isoamyl-1-nonylamine	$C_{14}H_{31}N$	DNP
-	-	319,040	517,1985333	-	-	-	-
				-1,22695	Aconitane-1,6,7,8,10,14,16-heptol; (1α,5β,6β,14α,16β)-form, 6-Ketone, 7,8-methylene, 1,16-di-Me, *N*-Et **OR** Anthriscifolcone B	$C_{23}H_{33}NO_7$	DNP
				-1,22695	1,6,7,8,14,16-Hexahydroxy-4-methylaconitan-19-one; (1α,5β,6β,14α,16β)-form, 7,8-Methylene ether, *O*1,*O*6,*O*16-tri-Me	$C_{23}H_{33}NO_7$	DNP
-	-	436,233	422,3716667	-1,22695	4-Hydroxy-3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)benzoic acid; Amide, *O*-β-D-glucopyranoside	$C_{23}H_{33}NO_7$	DNP
				-1,22695	Protostemodiol	$C_{23}H_{33}NO_7$	DNP
				-1,22695	Stemonalactam M	$C_{23}H_{33}NO_7$	DNP
-	-	199,975	41,0427	-	-	-	-
-	-	903,561	863,459	-	-	-	-
-	-	903,561	863,117	-	-	-	-

4. Discussão

Segundo a literatura científica, as bioatividades apresentadas pelas amostras da microalga *Chlorococcum* sp. nos ensaios *in vitro*, anti-esteatose e anti-inflamatório, e *in vivo*, anti-obesidade e anti-diabetes em larvas de peixe-zebra, não foram analisadas e verificadas noutras investigações. Deste modo, este trabalho é o primeiro a investigar extratos da microalga *Chlorococcum* sp. em relação ao seu potencial anti-esteatose num modelo celular *in vitro* e anti-diabetes e de redução da quantidade lipídica em larvas de peixe-zebra *in vivo*. Além disso, este trabalho mostra-se também o primeiro a investigar a função das diferentes metodologias de extração da biomassa da microalga testada e identificar possíveis moléculas que implicam as bioatividades detetadas. Apenas foi demostrada a presença do composto astaxantina na microalga *Chlorococcum* sp.. Este composto encontra-se presente numa ampla variedade de organismos vivos, nomeadamente outras microalgas, *Haematococcus pluvialis* e *Chlorella zofingiensis* (Yuan et al., 2011). Astaxantina é um carotenóide xantofílico, aprovado como suplemento dietético pelo *Food and Drug Amninistration* (Riccioni et al., 2011). Apresenta propriedades antioxidantes, anti-diabéticas e anti-inflamatórias (H. Wang, Fu, & Han, 2021). Sobre este último, este composto demonstrou inibição da expressão ou produção de mediadores inflamatórios e citocinas em células RAW264.7, estimuladas por um lipopolissacarídeo (Yuan et al., 2011). Por outro lado, foi indicado pela redução de tecido adiposo (Hazarika, Ahmed, & Chandrul, 2019). Os efeitos anti-tumorais de polissacarídeos extracelulares da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos com etanol a 70%, foram estudados *in vitro* com as linhas celulares de cancro de cólon humano HCT116 e HCT8. Os polissacarídeos demonstraram efeitos anti-tumorais significativos em ambas as linhas celulares, na concentração de 0.6 mg/mL (J. Zhang et al., 2019). Para além disso, extratos da microalga *Chlorococcum* sp. demonstraram também potenciais efeitos antioxidantes (Conde, Neves, et al., 2021; Olasehinde et al., 2021), antitrombóticos (Shiels et al., 2021) e atividade inibitória de acetilcolinesterase (Olasehinde et al., 2021). Como já mencionado anteriormente, as microalgas são uma potencial fonte de produtos de alto valor e novas moléculas que podem ser interessantes para a exploração biotecnológica e farmacêutica. Assim, como abordado em seguida, outras microalgas já demonstraram o seu potencial anti-esteatose, anti-inflamatório, anti-obesidade e anti-diabetes, em modelos celulares *in vitro* e *in vitro*.

As doenças hepáticas caracterizam-se por um acúmulo excessivo de gordura, mais concretamente triglicerídeos, no fígado. A principal causa de excesso de gordura hepática é a obesidade, correlacionada com a resistência à insulina. A doença hepática gordurosa não alcoólica caraterizada por esteatose hepática, retenção anormal de lípidos

dentro da célula, relaciona-se com a síndrome metabólica e as suas associações, como a diabetes *mellitus* (Bagherniya et al., 2018). Estudos sobre terapias alternativas, baseadas em compostos naturais, têm ganhado uma expressão significativa, devido aos potenciais efeitos adversos das terapias convencionais. Tendo como exemplo, *Silybum marianum* uma das plantas mais populares no tratamento de doenças hepáticas. A Silimarina, um extrato desta planta, apresenta propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e anti-fibróticas, sendo assim usada como agente terapêutico para diversas doenças hepáticas. Em relação à atividade de prevenção da progressão da doença hepática gordurosa não alcoólica, Silimarina atua ao nível do stress oxidativo, resistência à insulina, acúmulo de gordura no fígado e disfunção mitocondrial (Bagherniya et al., 2018). A linha celular HepG2, células de cancro de fígado humano, apresentam alta diferenciação e diversas características de genótipos de hepatócitos de fígado humano. Desta maneira, constituem um sistema modelo ideal para estudos do metabolismo do fígado humano *in vitro* (Y.-M. Wang et al., 2020). A incubação das células HepG2 com Oleato de Sódio permitiu a indução de um aumento de gordura nas células, *fat-overloaded*, simulando uma situação de esteatose hepática (Gómez-Lechón et al., 2007). Ao observar os resultados das metodologia i*maging*, para a maior concentração de exposição 25 µg/mL, os extratos da microalga *Chlorococcum* sp. extraídos por HPP com o solvente acetona e intensidade de pressão, CL10 e CL22, mostraram um maior potencial de redução do conteúdo lipídico em células HepG2 *fat-overloaded*. Apesar de os resultados referidos anteriormente terem sido os primeiros a serem comprovados, o procedimento e modelo celular utilizado neste trabalho, no qual a linha celular HepG2 foi exposta ao composto Oleato de Sódio para induzir esteatose nas células, foi descrito anteriormente (Costa et al., 2019). Os autores exploraram o potencial de 263 frações obtidas de 46 estirpes de cianobactérias, verificando 17 frações com atividade promissora no metabolismo lipídico, potencial anti-esteatose, numa concentração testada de 10 µg/mL. Além disso, outras microalgas demostraram resultados promissores referentes à diminuição da esteatose hepática em modelos de estudo *in vivo*. Como é o caso de *Euglena gracilis* que inibiu o processo de fibrose hepática em ratinhos. Além de ser sujeitos a uma dieta alimentar rica em gordura suplementada com 3.0 g/kg de extrato da microalga testada, durante 14 dias de tratamento, aos ratinhos foi administrado 200 µg de estreptozocina, com o intuito de conferir resistência à insulina (Nakashima et al., 2019). Outro estudo foi descrito (Gangadhar et al., 2020), no qual a microalga *Tisochrysis lutea*, constituída por ácidos gordos polinsaturados (ômega-3) e carotenóides, demonstrou efeitos promissores ao induzir perda de peso e redução dos níveis de glicose e colesterol em ratinhos diabéticos.

A inflamação crónica sistémica encontra-se associada à obesidade, desempenhando um papel relevante noutras patologias, tais como resistência à insulina e diabetes *mellitus* tipo 2. O estado inflamatório grave caracteriza-se pela produção de macrófagos, mas também células imunes que se infiltram ou emergem no tecido adiposo, desencadeando uma resposta inflamatória (Sun et al., 2012). Mediadores, cujas funções englobam o recrutamento de células durante a resposta inflamatória, incluem radicais livres (NO e O_2^-), mediadores lipídicos e citocinas pró-inflamatórias. O Óxido Nítrico apresenta-se como um mediador da resposta inflamatória, produzido através do seu precursor, L-arginina, pela ação da enzima específica síntase do Óxido Nítrico indutível (iNOS), superexpressada por macrófagos ativados. Desta forma, a quantidade de NO pode ser quantificada fornecendo uma medida do processo inflamatório, refletindo o grau de inflamação dos macrófagos (Marcinkiewicz, Marcinkiewicz & Chłopicki, 2003). A viabilidade celular neste trabalho foi determinada para estudar possíveis efeitos citotóxicos, através da atividade metabólica mitocondrial das células, ensaio MTT. O ensaio MTT baseia-se num ensaio colorimétrico sustentado na atividade metabólica das células. A reação bioquímica consiste na conversão de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) em sais de formazano pela desidrogenase celulares das células metabolicamente ativas. Os sais formados ao serem dissolvidos com Dimetilsulfóxido libertam uma cor roxa, com um espectro de absorção de 510 nm. Sendo a quantidade de formazano diretamente proporcional ao número de células vivas (Stockert et al., 2012). Relativamente aos resultados deste trabalho, todos os extratos com etanol 46% e acetona apresentaram atividade anti-inflamatória, independente da pressão aplicada na extração HPP. As amostras extraídas com o solvente etanol 96% apresentaram os resultados mais promissores de todo o ensaio, com uma redução quase total da inflamação das células. A atividade anti-inflamatória de extratos da microalga *Chlorococcum* sp., extraídos com acetona e etanol, é relatada pela primeira vez neste estudo. O potencial da microalga *Chlorococcum* sp. para prevenir a inflamação já havia sido demonstrado em modelos celulares *in vitro*. Glico- e fosfolípidos extraídos de uma espécie de *Chlorococcum* sp. marinha mostraram atividade anti-inflamatória em plaquetas humanas, nomeadamente inibição do fator ativador de plaquetas, na concentração de 50 e 100 µg/mL (Shiels et al., 2021). Extratos lipídicos de *Chlorococcum amblystomatis*, extraídos com diclorometano, apresentaram atividade inibidora da COX-2, na concentração de 50 µg/mL. A COX-2 é um elemento importante na resposta inflamatória, associada à atividade pró-inflamatória, responsável pela produção de prostaglandina E2 (Conde, Couto, et al., 2021). A capacidade anti-inflamatória de extratos da microalga *Micractinium* sp. de água doce extraídos com etanol foi avaliado, com a linha celular RAW 264.7 exposta ao LPS (0.5 µg/mL), e o intuito de induzir a inflamação

nas células (Suh et al., 2018). Nesse estudo, foram usadas diversas concentrações de extratos da microalga testada, 0, 5, 10, 20, and 40 µg/mL. A atividade anti-inflamatória dos extratos foi determinado avaliando mediadores pro-inflamatórios (iNOS e COX-2 genes) e citocinas pró-inflamatórias (TNF-α e IL-6). A atividade anti-inflamatória dos extratos confirmou-se, mesmo com as menores concentrações testadas, através da redução da produção de Óxido Nítrico (NO) e expressão de iNOS/COX-2. Além disso, os extratos da microalga *Micractinium* sp. demostraram-se um regulador promissor de processos inflamatórios, devido à diminuição significativa de TNF-α e IL-6, citocinas pró-inflamatórias. Além disso, extratos brutos da microalga *Cylindrotheca closterium* mostraram-se eficazes na atividade anti-inflamatória, inibindo significativamente o fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), em células de monócitos humanos THP-1 estimuladas por LPS. Os autores identificaram a fração C como a mais ativa, com o composto 1-palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina em maior abundância, inibindo a expressão de TNF-α, nas concentrações testadas, 50 g/mL e 100 g/mL (Lauritano et al., 2020).

A obesidade, considerada uma epidemia, associa-se a diversos problemas de saúde, representando um perigo para a saúde humana,. Esta doença define-se pelo acumular excessivo de gordura em várias regiões do corpo, prejudicando o bem-estar e aumentando o risco de mortalidade (Jiang et al., 2016). No que diz respeito ao tratamento para a obesidade, muitos medicamentos foram considerados inseguros e pouco eficazes. Assim, novas moléculas, derivadas de compostos naturais, são necessárias para o tratamento eficaz da obesidade com menos efeitos adversos. Segundo alguns estudos já existentes, os polifenóis, produtos naturais isolados de plantas, apresentam propriedades antioxidantes. Mais concretamente, o caso de mangiferina, que já foi sinalizada pelas suas propriedades anti-obesidade, através da inibição de pré-adipócitos e supressão do acúmulo de lípidos (Urbatzka et al., 2018). Além disso, um estudo realizado no CIIMAR, com o objetivo de rastrear uma biblioteca de 85 polifenóis quimicamente modificados referente à atividade redutora de lípidos, usando o modelo de peixe-zebra, conclui que vários compostos apresentaram uma forte atividade de redução de lípidos em larvas de peixe-zebra *in vivo* (Urbatzka et al., 2018). O potencial dos extratos da microalga *Chlorococcum* sp. no ensaio anti-obesidade, capacidade dos extratos em reduzir o teor de lípidos neutros, foi avaliado pela primeira vez no que se refere a esta microalga, visto que não foram encontrados estudos acerca desta estirpe. Destaca-se o extrato CL8, extraído pelo solvente etanol 96% (500 MPa/15 min), com o resultado mais significativo de todo o ensaio, e o extrato CL22, extraído pelo solvente acetona (420 MPa/9 min), com resultados significativos para a atividade de redução do conteúdo lipídico em ambos os modelos testados, *in vitro* e *in vivo*. O *screening* de extratos de microalgas (mais

concretamente cianobactérias) perante a redução do conteúdo lipídico em larvas de peixe-zebra, análise efetuada incidindo na região do intestino/saco vitelino, no qual os lipídios neutros são corados com Nile Red, já foi descrito anteriormente (Costa et al., 2019). Outros estudos descreveram compostos bioativos com potencial de redução de lipídios em ratinhos. Os efeitos anti-obesidade foram comprovados por polissacarídeos de *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina platensis*, extraídos com etanol a 80% (Guo et al., 2021). Os ratinhos foram sujeitos a uma dieta alimentar diária, durante 10 semanas, rica em gordura, suplementada com 400 mg/kg de extratos de *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina platensis*, separadamente. A ingestão de alimentos (*food intake*) foi registada a cada 2 dias e o peso corporal foi medido uma vez por semana. Ambos os grupos sujeitos à dieta suplementada com os extratos das microalgas testadas demonstraram níveis mais baixos de triglicerídeos e colesterol (não HDL), diminuição da deposição de gordura no fígado e redução do excesso de peso induzido pela dieta alimentar rica em gordura, em relação ao grupo controlo (ratinhos sujeitos a uma dieta alimentar normal). Segundos os autores Guo et al., 2021, os polissacarídeos da microalgas *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina platensis* podem constatar uma terapia alternativa para o tratamento de doentes obesos.

Dados epidemiológicos comprovam que a resistência à insulina é uma das principais razões para o desenvolvimento de diabetes tipo 2, mais comum de todos os tipos de diabetes. A diabetes tipo 2 é uma doença crônica caracterizada por níveis elevados de glicose no sangue. Por outro lado, a disrupção entre a função das células β do pâncreas e a sensibilidade à insulina é responsável pela hiperglicemia (S. E. Kahn, 2000). Muitos pacientes com diabetes tipo 2 apresentam hiperglicemia como resultado de deficiências na secreção de insulina. Esta doença, com proporções epidémicas, associa-se à obesidade, com um aumento da percentagem do tecido adiposo. Novas medidas de tratamento devem ser descobertas como alternativa às terapias convencionais, devido aos seus efeitos secundários nocivos, para prevenir ou minimizar a resistência à insulina e, assim, reduzir a prevalência de diabetes tipo 2. (Fujimoto, 2000). O *screening* dos extratos da microalga *Chlorococcum* sp. no ensaio anti-diabetes baseou-se na quantificação da percentagem de uptake de 2-NBDG, uma análogo fluorescente com marcadores da glucose (GLUTs), nas larvas de peixe-zebra. A análise efetuada incidiu na região do olho e saco vitelino, uma vez que a expressão dos transportadores de glucose, nesta fase de desenvolvimento larval, já foi descrita (Tseng et al., 2009). Evidencia-se as amostras extraídas com o solvente água, CL14 e CL25, aumentando mais de 100% a intensidade de fluorescência no olho de larvas de peixe-zebra, em comparação com o controlo. Estes resultados mostraram-se os primeiros a serem comprovados com esta

microalga. O potencial da microalga *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina platensis* para prevenir a resistência à insulina, atividade anti-diabetes, já foi comprovado em ratinhos (Wan et al., 2019). Nesse estudo avaliou-se a tolerância à glicose em 6 grupos distintos, após 8 semanas submetidos a uma dieta rica em gordura e sacarose com suplementação de extratos de *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina platensis*. Os extratos das microalgas testadas foram extraídos com o solvente etanol 55%, a 50ºC durante 1 hora, e água destilada, a 80ºC durante 1 hora. Entre os 6 grupos de estudo, 2 grupos representaram o grupo controlo, tratados com uma dieta alimentar normal. Os restantes 4 grupos foram tratados com uma dieta rica em gordura e sacarose, suplementados com 150 mg/kg por dia com extratos das microalgas. Comparando a análise de glicemia em jejum dos ratinhos, entre a semana 0 e após 8 semanas de tratamento, um indicador importante para investigar a gravidade da diabetes, contatou-se que a tolerância à glicose foi melhorada e a composição microbiota intestinal alterada nos ratinhos suplementados com extratos de *Chlorella pyrenoidosa* e *Spirulina platensis*, extraídos com ambos os solventes. O presente trabalho fornece novas evidências experimentais para a prevenção e tratamento de diabetes *mellitus*. Da mesma forma, a microalga *Porphyridium cruentum*, uma microalga vermelha, demostrou a capacidade de resolver casos de hiperglicemia e diabetes em ratinhos diabéticos (Setyaningsih et al., 2020). Neste estudo, o efeito da atividade anti-hiperglicémica da biomassa de *Porphyridium cruentum*, capaz de produzir por polissacarídeos extracelulares, em várias concentrações, foi estudado em ratinhos diabéticos induzidos por estreptozotocina, uma injeção intraperitoneal de solução de estreptozotocina (40 mg/kg de peso corporal) durante 3 dias. A biomassa da microalga foi extraída pelo método de sedimentação, a 40ºC durante 12 horas. Já os polissacarídeos da microalga foram obtidos por precipitação de fase líquida usando etanol 96%. As doses de biomassa estudadas foram 600, 1200 e 1800 mg/kg de peso corporal, enquanto as doses de polissacarídeos foram 150, 300 e 450 mg/kg de peso corporal. Os níveis de glicose no sangue e o peso corporal foram quantificados a cada 2 dias, em contrapartida a ingestão de alimentos (*food intake*) foi determinada todos os dias. Após 14 dias de tratamento, os resultaram indicaram que a biomassa da microalga testada e os respetivos polissacarídeos extracelulares demostraram-se capazes de diminuir o *food intake*, mas apenas o tratamento com os polissacarídeos extracelulares diminui os níveis de glucose no sangue dos ratinhos diabéticos. O tratamento 450 mg/kg de peso corporal de polissacarídeos extracelulares demonstrou-se o mais eficaz na redução dos níveis de glucose no sangue de ratinhos diabéticos. Desta forma, os autores Setyaningsih et al., 2020 concluíram que a microalga *Porphyridium cruentum* apresenta potencial para o tratamento de hiperglicemia e diabetes.

Com o objetivo de estudar os mecanismos de ação moleculares dos extratos mais promissores com atividade anti-esteatose da microalga *Chlorococcum* sp., amostra ativa CL10 e CL22, ambas extraídas com o solvente acetona por HPP, foram selecionados alguns alvos importantes na regulação do metabolismo lipídico e adipogénese (CEBPα, ACACα, PRKA-β1, PPAR γ, ACACα Phospho-Ser80 e PRKA-β1 Phospho-Ser181) e realizados vários Western Blot (Figura 25). Contextualizando alguns dos exemplos referidos anteriormente, segundo a literatura, CEBPα é um fator de transcrição com diversas funções, entre as quais regulação do metabolismo de lípidos, diferenciação adequada de células em vários tecidos, nomeadamente desenvolvimento hepático, adipogénico e hematopoiético, e controlo da progressão do ciclo celular (Ohlsson et al., 2016). Para além disso, CEBPα é capaz de induzir diversos genes envolvidos na adipogénese. Vários estudos *in vivo* revelaram que este alvo desempenha um papel importante no desenvolvimento do tecido adiposo (Seo et al., 2018). Por outro lado, PPAR γ não está apenas envolvido na adipogénese, diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros, mas também é responsável pela manutenção do estado diferenciado dos adipócitos (Rosen & MacDougald, 2006). Esta proteína é expressa no tecido adiposo, mas também noutros tecidos, como o fígado. No tecido adiposo, PPAR γ desempenha um papel fundamental no metabolismo lipídico. Além disso, está envolvido em vários sistemas biológicos, desempenhando um papel multifuncional a nível celular, incluindo o metabolismo da glicose, resposta inflamatória e angiogénese (Inoue et al., 2005). No que diz respeito ao único resultado estatisticamente significativo nos Western Blot realizados (Figura 25a), verificou-se que o extrato CL22 (420 MPa/9 min) foi capaz de diminuir significativamente a expressão de CEBPα, proteína envolvida na maturação de pré-adipócitos. Extratos da microalga *Spirulina maxima*, extraídos por ultrassom com etanol 70%, foram demonstrados pela capacidade de redução de gotículas lipídicas em ratinhos sujeitos a uma dieta alimentar rica em gordura suplementada com extratos da microalga testada, e de supressão da expressão de proteínas adipogénicas, nomeadamente CEBPα, em adipócitos 3T3-L1 de ratinhos (Seo et al., 2018). Os autores aplicaram concentrações de 50 and 100 µg/mL de extratos da microalga testada, no ensaio de redução da expressão de proteínas adipogénicas.

Com a finalidade de identificar metabólitos interessantes, conhecidos ou desconhecidos, que possam ter contribuído para as bioatividades observadas nas amostras ativas, CL10 e CL22, foi realizado um perfil metabólico. No molecular *networking* foi obtido um total de 41 metabólitos (*nodes*), conhecidos e desconhecidos, presentes em clusters únicos de amostras ativas (Tabela 4), podendo ser responsáveis pela bioatividade observada no ensaio anti-esteatose na linha celular HepG2. Entre os 21

picos de massa que foram identificados, através da comparação do precursor mass (M + H), 2 foram identificados automaticamente na base de dados *Global Natural Products Social Molecular Networking* (GNPS) e os outros 19 através da pesquisa manual na *database* pública *Dictionary of Natural Products* (DNP). Alguns exemplos das moléculas com diversidade química relevante: Triangulyne E (-0,474 ppm), Pheophytin A, Bidenphytin A (-1,879 ppm), Anthriscifolcone B (-1,227 ppm), Protostemodiol (-1,227 ppm), Stemonalactam M (-1,227 ppm). A molécula Pheophytin A, segundo a literatura científica, relaciona-se com a diminuição de algumas características da obesidade, representando um novo e promissor candidato, de origem natural, para o tratamento da obesidade. (Semaan, 2014). Os restantes 19 picos de massa não foram possíveis de serem identificados podem representar eventualmente novos compostos. Por outro lado, foram identificados no molecular networking 4 clusters distintos pelo software *MolNetEnhancer* (Figura 27), *Lipids and lipid-like molecules*, *Benzenoids*, *Organic oxygen compounds* e *Phenylpropanoids and polyketides*. Apesar dos resultados acima mencionados, um novo fracionamento dos extratos seria necessário para identificar completamente os metabólitos pressentes nas amostras ativas, justificando as bioatividades observadas. O facto de não ter sido encontrada uma associação clara entre os 40 picos de massa obtidos e as atividades anti-obesidade ou anti-esteatose, deve-se à grande percentagem (47.5%) de picos de massa não identificados, com a hipótese de representarem novos compostos. No entanto, este resultado encontra-se de acordo com outros estudos em cianobactérias (Bellver et al., 2021) e actinobactérias (Santos et al., 2019), onde diversos extratos ou frações com efeitos promissores na absorção intestinal de lípidos não se encontram identificados nas bases de dados, sendo necessário mais estudos para identificar completamente tais compostos.

5. Conclusão

O objetivo deste trabalho consistiu no estudo de extratos da microalga *Chlorococcum sp.*, extraídos por HPP e tratamento óhmico, em relação ao seu potencial anti-esteatose e anti-inflamatório, em modelos celulares *in vitro*, e anti-diabetes e anti-obesidade, em larvas de peixe-zebra *in vivo*.

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que atividades promissoras foram descobertas pela primeira vez na microalga *Chlorococcum* sp., nomeadamente anti-esteatose, anti-obesidade e anti-diabetes. As amostras extraídas por HPP se mostraram mais eficazes na obtenção de resultados significativos perante os bioensaios realizados. Extratos HPP extraídos com o solvente acetona demonstraram atividade significativa nos ensaios anti-esteatose, anti-inflamatório e anti-obesidade. Com destaque para a amostra CL22, que demonstrou resultados significativos para a atividade de redução do conteúdo lipídico em ambos os modelos testados, *in vitro* e *in vivo*.

Os extratos mais ativos no ensaio anti-esteatose, extraídos com o solvente acetona (CL10 e CL22), foram comparados com os extratos não ativos (CL34, CLC11 e CLC22) através de um molecular *networking*, gerado com os dados de LC-MS/MS, no qual se obteve um total de 41 nodes, conhecidos e desconhecidos, presentes em *clusters* únicos de amostras ativas no ensaio anti-esteatose. Entre os 21 picos de massa que foram identificados, a molécula Pheophytin A, segundo a literatura científica, relaciona-se com a diminuição de algumas características da obesidade. Por outro lado, os restantes 19 picos de massa não foram possíveis de serem identificados podem representar eventualmente novos compostos.

Através da técnica Western Blot, com o estudo de diversos alvos importantes na regulação do metabolismo lipídico e adipogénese, verificou-se que a amostra CL22 diminui significativamente a expressão de CEBPα, um fator de transcrição responsável pela diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos maduros.

Futuramente, um novo fracionamento dos extratos deve ser realizado, com o intuito de compreender os mecanismos de ação dos extratos bioativos, como também o isolamento e identificação dos metabólitos responsáveis pelas bioatividades observadas.

6. Referências

Bagherniya, M., Nobili, V., Blesso, C. N., & Sahebkar, A. (2018). Medicinal plants and bioactive natural compounds in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: A clinical review. *Pharmacological Research*, *130*, 213–240. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.12.020

Bellver, M., Costa, S. L., Sanchez, B. A., Vasconcelos, V., & Urbatzka, R. (2021). Inhibition of Intestinal Lipid Absorption by Cyanobacterial Strains in Zebrafish Larvae. *Marine Drugs* . https://doi.org/10.3390/md19030161

Benchoula, K., Khatib, A., Jaffar, A., Ahmed, Q. U., Sulaiman, W. M. A. W., Wahab, R. A., & EL-Seedi, H. R. (2019). The promise of zebrafish as a model of metabolic syndrome. *Experimental Animals*, *advpub*. https://doi.org/10.1538/expanim.18-0168

Cáceres, T., Megharaj, M., & Naidu, R. (2008). Toxicity and transformation of fenamiphos and its metabolites by two micro algae Pseudokirchneriella subcapitata and Chlorococcum sp. *Science of The Total Environment*, *398*(1), 53–59. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.022

Cao, Y., Chen, J., Ren, G., Zhang, Y., Tan, X., & Yang, L. (2019). Punicalagin Prevents Inflammation in LPS-Induced RAW264.7 Macrophages by Inhibiting FoxO3a/Autophagy Signaling Pathway. *Nutrients*, *11*(11). https://doi.org/10.3390/nu11112794

Castro, M., Preto, M., Vasconcelos, V., & Urbatzka, R. (2016). Obesity: The Metabolic Disease, Advances on Drug Discovery and Natural Product Research. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, *16*(23), 2577–2604. https://doi.org/10.2174/1568026616666160415155644

Chen, T.-H., Wang, Y.-H., & Wu, Y.-H. (2011). Developmental exposures to ethanol or dimethylsulfoxide at low concentrations alter locomotor activity in larval zebrafish: implications for behavioral toxicity bioassays. *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)*, *102*(3–4), 162–166. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.01.010

Conde, T. A., Couto, D., Melo, T., Costa, M., Silva, J., Domingues, M. R., & Domingues, P. (2021). Polar lipidomic profile shows Chlorococcum amblystomatis as a promising source of value-added lipids. *Scientific Reports*, *11*(1), 4355. https://doi.org/10.1038/s41598-021-83455-y

Conde, T. A., Neves, B. F., Couto, D., Melo, T., Neves, B., Costa, M., … Domingues, M. R. (2021). Microalgae as Sustainable Bio-Factories of Healthy Lipids: Evaluating

Fatty Acid Content and Antioxidant Activity. *Marine Drugs* . https://doi.org/10.3390/md19070357

Costa, M., Rosa, F., Ribeiro, T., Hernandez-Bautista, R., Bonaldo, M., Gonçalves Silva, N., … Urbatzka, R. (2019). Identification of Cyanobacterial Strains with Potential for the Treatment of Obesity-Related Co-Morbidities by Bioactivity, Toxicity Evaluation and Metabolite Profiling. *Marine Drugs*, *17*(5). https://doi.org/10.3390/md17050280

Engin, A. (2017). The Pathogenesis of Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation BT - Obesity and Lipotoxicity. In A. B. Engin & A. Engin (Eds.) (pp. 221–245). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-48382-5_9

Fujimoto, W. Y. (2000). The importance of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Medicine*, *108*(6, Supplement 1), 9–14. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00337-5

Gangadhar, K. N., Rodrigues, M. J., Pereira, H., Gaspar, H., Malcata, F. X., Barreira, L., & Varela, J. (2020). Anti-Hepatocellular Carcinoma (HepG2) Activities of Monoterpene Hydroxy Lactones Isolated from the Marine Microalga Tisochrysis Lutea. *Marine Drugs*, *18*(11). https://doi.org/10.3390/md18110567

Ghosh, T., Paliwal, C., Maurya, R., & Mishra, S. (2015). Microalgal Rainbow Colours for Nutraceutical and Pharmaceutical Applications BT - Plant Biology and Biotechnology: Volume I: Plant Diversity, Organization, Function and Improvement. In B. Bahadur, M. Venkat Rajam, L. Sahijram, & K. V Krishnamurthy (Eds.) (pp. 777–791). New Delhi: Springer India. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_32

Goldstein, B. J. (2002). Insulin resistance as the core defect in type 2 diabetes mellitus. *The American Journal of Cardiology*, *90*(5, Supplement 1), 3–10. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9149(02)02553-5

Gómez-Lechón, M. J., Donato, M. T., Martínez-Romero, A., Jiménez, N., Castell, J. V., & O'Connor, J.-E. (2007). A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chemico-Biological Interactions*, *165*(2), 106–116. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbi.2006.11.004

Guo, W., Zhu, S., Li, S., Feng, Y., Wu, H., & Zeng, M. (2021). Microalgae polysaccharides ameliorates obesity in association with modulation of lipid metabolism and gut microbiota in high-fat-diet fed C57BL/6 mice. *International Journal of Biological Macromolecules*, *182*, 1371–1383. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.067

Harvey, A. L. (2008). Natural products in drug discovery. *Drug Discovery Today*, *13*(19),

894–901. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.07.004

Harwati, T. U., Willke, T., & Vorlop, K. D. (2012). Characterization of the lipid accumulation in a tropical freshwater microalgae Chlorococcum sp. *Bioresource Technology*, *121*, 54–60. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.098

Hazarika, H. J., Ahmed, A., & Chandrul, K. K. (2019). Miracle of Herbals and Natural Products in Treatment and Regulation of Obesity.

Inoue, M., Ohtake, T., Motomura, W., Takahashi, N., Hosoki, Y., Miyoshi, S., … Okumura, T. (2005). Increased expression of PPARγ in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *336*(1), 215–222. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.070

Jiang, S., Lu, W., Zong, X., Ruan, H., & Liu, Y. (2016). Obesity and hypertension (Review). *Exp Ther Med*, *12*(4), 2395–2399. https://doi.org/10.3892/etm.2016.3667

Kahn, B. B. (1998). Type 2 diabetes: When insulin secretion fails to compensate for insulin resistance. *Cell*, *92*(5), 593–596. https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81125-3

Kahn, S. E. (2000). The importance of the β-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus11Supported in part by National Institutes of Health grants DK-02654, DK-17047, DK-50703, and the Medical Research Service of the Department of Veterans Affairs. *The American Journal of Medicine*, *108*(6, Supplement 1), 2–8. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0002-9343(00)00336-3

Kahn, S. E., Hull, R. L., & Utzschneider, K. M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*, *444*(7121), 840–846. https://doi.org/10.1038/nature05482

Kennedy, A. J., Ellacott, K. L. J., King, V. L., & Hasty, A. H. (2010). Mouse models of the metabolic syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, *3*(3–4), 156–166. https://doi.org/10.1242/dmm.003467

Kong, L., Smith, W., & Hao, D. (2019). Overview of RAW264.7 for osteoclastogensis study: Phenotype and stimuli. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *23*(5), 3077–3087. https://doi.org/10.1111/jcmm.14277

Krentz, A. J., Fujioka, K., & Hompesch, M. (2016). Evolution of pharmacological obesity treatments: focus on adverse side-effect profiles. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, *18*(6), 558–570. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/dom.12657

Lauritano, C., Helland, K., Riccio, G., Andersen, J. H., Ianora, A., & Hansen, E. H. (2020). Lysophosphatidylcholines and Chlorophyll-Derived Molecules from the Diatom Cylindrotheca closterium with Anti-Inflammatory Activity. *Marine Drugs*, *18*(3). https://doi.org/10.3390/md18030166

Lin, Y.-C., Chang, P.-F., Yeh, S.-J., Liu, K., & Chen, H.-C. (2010). Risk Factors for Liver Steatosis in Obese Children and Adolescents. *Pediatrics & Neonatology*, *51*(3), 149–154. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1875-9572(10)60028-9

Liu, R., & Nikolajczyk, B. S. (2019). Tissue Immune Cells Fuel Obesity-Associated Inflammation in Adipose Tissue and Beyond. *Frontiers in Immunology*, *10*, 1587. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01587

Lu, W.-Y., Li, H.-J., Li, Q.-Y., & Wu, Y.-C. (2021). Application of marine natural products in drug research. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *35*, 116058. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116058

Lv, J., Guo, J., Feng, J., Liu, Q., & Xie, S. (2017). Effect of sulfate ions on growth and pollutants removal of self-flocculating microalga Chlorococcum sp. GD in synthetic municipal wastewater. *Bioresource Technology*, *234*, 289–296. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.03.061

Lv, J., Wang, X., Liu, W., Feng, J., Liu, Q., Nan, F., … Xie, S. (2018). The Performance of a Self-Flocculating Microalga Chlorococcum sp. GD in Wastewater with Different Ammonia Concentrations. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *15*, 434. https://doi.org/10.3390/ijerph15030434

Ma, J., Yin, H., Li, M., Deng, Y., Ahmad, O., Qin, G., … Shang, J. (2019). A Comprehensive Study of High Cholesterol Diet-Induced Larval Zebrafish Model: A Short-Time In Vivo Screening Method for Non-Alcoholic Fatty Liver Disease Drugs. *International Journal of Biological Sciences*, *15*(5), 973–983. https://doi.org/10.7150/ijbs.30013

Mahapatra, D., & Ramachandra, T. V. (2013). Algal biofuel: Bountiful lipid from Chlorococcum sp. proliferating in municipal wastewater. *Current Science*, *105*, 47–55.

Malicki, J., Avanesov, A., Li, J., Yuan, S., & Sun, Z. (2011). Analysis of cilia structure and function in zebrafish. *Methods in Cell Biology*, *101*, 39–74. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387036-0.00003-7

Malve, H. (2016). Exploring the ocean for new drug developments: Marine pharmacology.

Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences, *8*(2), 83–91. https://doi.org/10.4103/0975-7406.171700

Marcinkiewicz, E. W. A., Marcinkiewicz, J., & Chłopicki, S. (2003). Nitric oxide: a pro-inflammatory and anti-inflammatory mediator. *Central-European Journal of Immunology*, *28*(2).

Metting, F. B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal of Industrial Microbiology*, *17*(5), 477–489. https://doi.org/10.1007/BF01574779

Mohamed, G. A., Ibrahim, S. R. M., Elkhayat, E. S., & El Dine, R. S. (2014). Natural anti-obesity agents. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*, *52*(2), 269–284. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2014.05.001

Nakashima, A., Sugimoto, R., Suzuki, K., Shirakata, Y., Hashiguchi, T., Yoshida, C., & Nakano, Y. (2019). Anti-fibrotic activity of Euglena gracilis and paramylon in a mouse model of non-alcoholic steatohepatitis. *Food Science & Nutrition*, *7*(1), 139–147. https://doi.org/10.1002/fsn3.828

Nakayama, H., Hata, K., Matsuoka, I., Zang, L., Kim, Y., Chu, D., … Shimada, Y. (2020). Anti-Obesity Natural Products Tested in Juvenile Zebrafish Obesogenic Tests and Mouse 3T3-L1 Adipogenesis Assays. *Molecules* . https://doi.org/10.3390/molecules25245840

Nakayama, H., Shimada, Y., Zang, L., Terasawa, M., Nishiura, K., Matsuda, K., … Nishimura, N. (2018). Novel Anti-Obesity Properties of Palmaria mollis in Zebrafish and Mouse Models. *Nutrients* . https://doi.org/10.3390/nu10101401

Ohlsson, E., Schuster, M. B., Hasemann, M., & Porse, B. T. (2016). The multifaceted functions of C/EBPα in normal and malignant haematopoiesis. *Leukemia*, *30*(4), 767–775. https://doi.org/10.1038/leu.2015.324

Olasehinde, T. A., Olaniran, A. O., & Okoh, A. I. (2021). Cholinesterase inhibitory activity, antioxidant properties, and phytochemical composition of Chlorococcum sp. extracts. *Journal of Food Biochemistry*, *45*(3), e13395. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jfbc.13395

Öztürk, E., Arslan, A. K. K., Yerer, M. B., & Bishayee, A. (2017). Resveratrol and diabetes: A critical review of clinical studies. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, *95*, 230–234. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.08.070

Pi-Sunyer, F. X. (2002). The Obesity Epidemic: Pathophysiology and Consequences of Obesity. *Obesity Research*, *10*(S12), 97S-104S.

https://doi.org/https://doi.org/10.1038/oby.2002.202

Rajesh, K., Rohit, M. V, & Venkata Mohan, S. (2017). Chapter 7 - Microalgae-Based Carotenoids Production. In R. P. Rastogi, D. Madamwar, & A. B. T.-A. G. C. Pandey (Eds.) (pp. 139–147). Amsterdam: Elsevier. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63784-0.00007-2

Riccioni, G., D'Orazio, N., Franceschelli, S., & Speranza, L. (2011). Marine Carotenoids and Cardiovascular Risk Markers. *Marine Drugs* . https://doi.org/10.3390/md9071166

Rochlani, Y., Pothineni, N. V., Kovelamudi, S., & Mehta, J. L. (2017). Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic Advances in Cardiovascular Disease*, *11*(8), 215–225. https://doi.org/10.1177/1753944717711379

Rosen, E. D., & MacDougald, O. A. (2006). Adipocyte differentiation from the inside out. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *7*(12), 885–896. https://doi.org/10.1038/nrm2066

Saha, S. K., & Murray, P. (2018). Exploitation of Microalgae Species for Nutraceutical Purposes: Cultivation Aspects. *Fermentation* . https://doi.org/10.3390/fermentation4020046

Sahu, A., Pancha, I., Jain, D., Paliwal, C., Ghosh, T., Patidar, S., … Mishra, S. (2013). Fatty acids as biomarkers of microalgae. *Phytochemistry*, *89*, 53–58. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.02.001

Santos, J. D., Vitorino, I., De la Cruz, M., Díaz, C., Cautain, B., Annang, F., … Lage, O. M. (2019). Bioactivities and Extract Dereplication of Actinomycetales Isolated From Marine Sponges. *Frontiers in Microbiology*, *10*, 727. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00727

Semaan, D. (2014). In vitro anti-diabetic and anti-obesity activities of compounds from the Cuban medicinal plant, Allophylus cominia (L.) Sw. University of Strathclyde.

Seo, Y.-J., Kim, K.-J., Choi, J., Koh, E.-J., & Lee, B.-Y. (2018). Spirulina maxima Extract Reduces Obesity through Suppression of Adipogenesis and Activation of Browning in 3T3-L1 Cells and High-Fat Diet-Induced Obese Mice. *Nutrients*, *10*(6). https://doi.org/10.3390/nu10060712

Setyaningsih, I., Prasetyo, H., Agungpriyono, D. R., & Tarman, K. (2020). Antihyperglycemic activity of Porphyridium cruentum biomass and extra-cellular polysaccharide in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of*

Biological Macromolecules, *156*, 1381–1386. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.178

Shiels, K., Tsoupras, A., Lordan, R., Nasopoulou, C., Zabetakis, I., Murray, P., & Saha, S. K. (2021). Bioactive Lipids of Marine Microalga Chlorococcum sp. SABC 012504 with Anti-Inflammatory and Anti-Thrombotic Activities. *Marine Drugs* . https://doi.org/10.3390/md19010028

Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *101*(2), 87–96. https://doi.org/https://doi.org/10.1263/jbb.101.87

Stienstra, R., van Diepen, J. A., Tack, C. J., Zaki, M. H., van de Veerdonk, F. L., Perera, D., … Kanneganti, T.-D. (2011). Inflammasome is a central player in the induction of obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(37), 15324 LP – 15329. https://doi.org/10.1073/pnas.1100255108

Stockert, J. C., Blázquez-Castro, A., Cañete, M., Horobin, R. W., & Villanueva, Á. (2012). MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, *114*(8), 785–796. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006

Suh, S.-S., Hong, J.-M., Kim, E. J., Jung, S. W., Kim, S.-M., Kim, J. E., … Kim, S. (2018). Anti-inflammation and Anti-Cancer Activity of Ethanol Extract of Antarctic Freshwater Microalga, Micractinium sp. *International Journal of Medical Sciences*, *15*(9), 929–936. https://doi.org/10.7150/ijms.26410

Sun, S., Ji, Y., Kersten, S., & Qi, L. (2012). Mechanisms of Inflammatory Responses in Obese Adipose Tissue. *Annual Review of Nutrition*, *32*(1), 261–286. https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071811-150623

Tseng, Y.-C., Chen, R.-D., Lee, J.-R., Liu, S.-T., Lee, S.-J., & Hwang, P.-P. (2009). Specific expression and regulation of glucose transporters in zebrafish ionocytes. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *297*(2), R275–R290. https://doi.org/10.1152/ajpregu.00180.2009

Urbatzka, R., Freitas, S., Palmeira, A., Almeida, T., Moreira, J., Azevedo, C., … Vasconcelos, V. (2018). Lipid reducing activity and toxicity profiles of a library of polyphenol derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *151*, 272–284. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.03.036

Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity

screening. *Nature Protocols*, *1*(3), 1112–1116. https://doi.org/10.1038/nprot.2006.179

Virote, B. do C. R. (2020). Zebrafish as an Experimental Model for the Study of Obesity. In A. R. da C. B. Vianna (Ed.) (p. Ch. 4). Rijeka: IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.88576

Wan, X.-Z., Li, T.-T., Zhong, R.-T., Chen, H.-B., Xia, X., Gao, L.-Y., … Zhao, C. (2019). Anti-diabetic activity of PUFAs-rich extracts of Chlorella pyrenoidosa and Spirulina platensis in rats. *Food and Chemical Toxicology : An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, *128*, 233–239. https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.017

Wang, H., Fu, Z., & Han, C. (2021). The Potential Applications of Marine Bioactives Against Diabetes and Obesity. *American Journal of Marine Science*, *2*(1), 1–8. Retrieved from http://pubs.sciepub.com/

Wang, Y.-M., Pan, X., He, Y., Chi, C.-F., & Wang, B. (2020). Hypolipidemic Activities of Two Pentapeptides (VIAPW and IRWWW) from Miiuy Croaker (Miichthys miiuy) Muscle on Lipid Accumulation in HepG2 Cells through Regulation of AMPK Pathway. *Applied Sciences* . https://doi.org/10.3390/app10030817

Yuan, J.-P., Chen, F., Liu, X., & Li, X.-Z. (2002). Carotenoid composition in the green microalga Chlorococcum. *Food Chemistry*, *76*(3), 319–325. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00279-5

Yuan, J.-P., Peng, J., Yin, K., & Wang, J.-H. (2011). Potential health-promoting effects of astaxanthin: A high-value carotenoid mostly from microalgae. *Molecular Nutrition & Food Research*, *55*(1), 150–165. https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mnfr.201000414

Zang, L., Maddison, L. A., & Chen, W. (2018). Zebrafish as a Model for Obesity and Diabetes. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *6*, 91. https://doi.org/10.3389/fcell.2018.00091

Zhang, J., Liu, L., Ren, Y., & Chen, F. (2019). Characterization of exopolysaccharides produced by microalgae with antitumor activity on human colon cancer cells. *International Journal of Biological Macromolecules*, *128*, 761–767. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.009

Zhang, X., Zhang, R., Lv, P., Yang, J., Deng, Y., Xu, J., … Yang, Y. (2015). Emodin up-regulates glucose metabolism, decreases lipolysis, and attenuates inflammation in vitro. *Journal of Diabetes*, *7*(3), 360–368. https://doi.org/10.1111/1753-0407.12190

Zhao, C., Luo, M.-T., Huang, C., Chen, X.-F., Xiong, L., Li, H.-L., & Chen, X.-D. (2019). Determining intracellular lipid content of different oleaginous yeasts by one simple and accurate Nile Red fluorescent method. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *49*(6), 597–605. https://doi.org/10.1080/10826068.2019.1587624

Zou, C., Wang, Y., & Shen, Z. (2005). 2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, *64*(3), 207–215. https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2005.08.001