



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *Spirulina* NOS PERFIS  
BIOQUÍMICO, HEMATOLÓGICO E NUTRICIONAL DE RATOS *Wistar* NUTRIDOS  
E DESNUTRIDOS**

LIDIANE MUNIZ MOREIRA

Prof.<sup>a</sup> Dra. Leonor Almeida de Souza Soares  
ORIENTADORA - FURG

Prof.<sup>a</sup> Dra. Rosane da Silva Rodrigues  
CO-ORIENTADORA - UFPel

RIO GRANDE/RS  
2010

**LIDIANE MUNIZ MOREIRA**  
Bacharel em Química de Alimentos

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *Spirulina* NOS PERFIS  
BIOQUÍMICO, HEMATOLÓGICO E NUTRICIONAL DE RATOS *Wistar* NUTRIDOS  
E DESNUTRIDOS**

**Dissertação apresentada para obtenção  
do título Mestre em Engenharia e Ciência  
de Alimentos**

Prof.<sup>a</sup> Dra. Leonor Almeida de Souza Soares  
ORIENTADORA - FURG

Prof.<sup>a</sup> Dra. Rosane da Silva Rodrigues  
CO-ORIENTADORA - UFPel

RIO GRANDE-RS  
2010

***“Aqueles que têm um grande autocontrole, ou que estão totalmente absortos no trabalho, falam pouco. Palavra e ação juntas não andam bem. Repare na natureza: trabalha continuamente, mas em silêncio.”***

***(Mahatma Gandhi)***

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente à **Universidade Federal do Rio Grande**, em especial o **Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos**, pela oportunidade de aprimoramento profissional durante a realização deste curso. **Em extensivo, a todos os funcionários, docentes e discentes** do programa.

**Agradeço a todos que, de alguma forma, participaram da realização deste trabalho.**

**Em especial, à minha orientadora Profa. Dra. Leonor Almeida de Souza Soares**, por sua atenção, dedicação, competência, estímulo, respeito e, sobretudo, pelo apoio desde o início desta caminhada. Agradeço também ao carinho e amizade, os quais foram fundamentais para com o meu crescimento profissional e pessoal.

**À Profa. Dra. Rosane da Silva Rodrigues** pela co-orientação e apoio durante a realização do experimento e elaboração deste documento, como também pela paciência e amizade. Aproveito para agradecer pelas oportunidades profissionais no transcorrer do curso de graduação, as quais foram de total importância para que eu chegasse até aqui.

**À Profa. Dra. Mirian Ribeiro Galvão Machado**, a qual também contribuiu muito para com o meu crescimento profissional e pessoal, estando presente desde o curso de graduação. Obrigada pelas palavras amigas e exemplo a seguir.

**A Profa. Dra. Eliana Badiale Furlong** pela ajuda e dicas valiosíssimas durante a elaboração do projeto e exame de qualificação. Pela presteza e oportunidade de realizar parte do experimento no Laboratório de Ciência de Alimentos.

**À Profa. Dra. Janaína Fernandes de Medeiros Burkert** por permitir que eu ministrasse algumas aulas sobre Análise Sensorial de Alimentos, contribuindo assim com a realização da disciplina de Estágio em Docência, requisito parcial para obtenção do título de mestre. **Em extensivo, agradeço aos alunos** pela compreensão e paciência durante as aulas.

**À Profa. Dra. Carmem Lúcia Garcez Ribeiro** pela realização de algumas análises e apoio durante a elaboração da dissertação. **Em extensivo ao Laboratório de Clínica Veterinária da Universidade Federal de Pelotas.**

**Às estagiárias Bruna Del Sacramento, Priscila Fonseca Freitas e Paulla Polidori.** Em especial, à acadêmica do curso de Bacharelado em Química de Alimentos, Bruna, meu sincero agradecimento pela dedicação, apoio, interesse e eficiência em tudo que lhe foi solicitado. Igualmente, agradeço **às colegas de pós-graduação Letícia Marques de Assis e Adriana Rodrigues Machado** pela disponibilidade, ajuda e amizade.

**Aos demais colegas do Laboratório de Ciência de Alimentos, em especial à Renata Benvenuti e Michele Souza. À Maria de Jesus pela presteza e alegria, características estas espalhadas pelo ambiente de trabalho. À Lisiane Carvalho pelo apoio inicial. À Deborah Otero pela ajuda sempre que solicitada, principalmente pelo “transporte FURG-UFPel e vice-versa” de documentos e reagentes. À Renata Fonseca pelas dicas sobre estatística e referências.**

**Ao Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, especialmente ao Prof. Med. Vet. Milton Amado e seus funcionários. Ao Laboratório de Grãos da mesma universidade, em especial ao Prof. Dr. Álvaro Renato Guerra Dias, pelo empréstimo de alguns equipamentos. Ao médico veterinário Rafael Tavares e às colegas de profissão Valéria Santos, Leandra Zaffalon e Angelita Leitão por todo o auxílio durante o experimento. À Profa. Dra. Andréa Rocha da Faculdade de Farmácia da Universidade Católica de Pelotas pela atenção e análises laboratoriais.**

**À minha amiga (e irmã por escolha própria) Joyce Borowski pela amizade e grande interesse no meu trabalho. Obrigada por estar sempre presente! Sem palavras para agradecer o teu trabalho como “translator” no primeiro artigo fruto desta pesquisa. Em extensivo ao meu cunhado Tim Mackenzie pelo apoio constante e ajuda na revisão das traduções.**

**Ao projeto PRÓ-ENGENHARIA (COOPERAÇÃO TÉCNICA PARA OBTENÇÃO DE BIOMASSA, BIOENERGIA E PRODUTOS DE ALTO VALOR AGREGADO A PARTIR DE MICROALGAS) e à CAPES pelo apoio financeiro, como também ao Prof. Dr. Jorge Alberto Vieira Costa, coordenador geral deste projeto.**

**Finalmente agradeço àqueles que sonham e lutam comigo desde o meu primeiro dia de vida: meu pai João Moreira, minha mãe Izolete Muniz e irmã Taciane M. Mackenzie. Aproveito para lhes pedir desculpas pelos momentos em que, em prol desta pesquisa e de tantos outros, não pude dispor da atenção que vocês mereciam.**

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE EQUAÇÕES.....	XI
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>XII</b>
RESUMO.....	XIII
ABSTRACT.....	XIV
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Objetivo Geral.....</b>	<b>3</b>
<b>2.2. Objetivos Específicos.....</b>	<b>3</b>
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>4</b>
<b>4. ESTUDOS NUTRICIONAIS SOBRE <i>Spirulina</i>.....</b>	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>8</b>
<b>5. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>9</b>
<b>5.1. Cianobactérias e biotecnologia.....</b>	<b>9</b>
<b>5.2. Cianobactéria <i>Spirulina</i>.....</b>	<b>10</b>
5.2.1. Legislação para <i>Spirulina</i> .....	11
5.2.2. Condições de crescimento e cultivo.....	11
5.2.3. Aspectos nutricionais.....	13
<b>5.3. Testes toxicológicos para proteína unicelular.....</b>	<b>17</b>
<b>6 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
<b>6.1. Material.....</b>	<b>20</b>
6.1.1. Biomassa microalgal.....	20

6.1.2. Modelo biológico.....	20
6.1.3. Ingredientes para elaboração das dietas.....	21
<b>6.2. Métodos.....</b>	<b>21</b>
6.2.1. Preparo da biomassa.....	21
6.2.2. Determinação da composição proximal da biomassa.....	22
6.2.3. Formulação das dietas.....	22
6.2.4. Preparo das dietas.....	24
6.2.5. Determinação da composição proximal das dietas.....	25
6.2.6. Experimento <i>in vivo</i> .....	25
6.2.7. Parâmetros ponderais e biológicos dos animais.....	28
6.2.8. Avaliações bioquímicas.....	28
6.2.9. Determinações hematológicas.....	28
6.2.10. Medidas antropométricas.....	29
6.2.11. Obtenção do fígado e gordura corporal.....	29
6.2.12. Tratamento das carcaças.....	29
6.2.13. Avaliação das fezes.....	29
6.2.13.1. Determinação de lipídios.....	30
6.2.13.2. Determinação de proteínas.....	30
6.2.14. Avaliação da qualidade nutricional das dietas.....	30
6.2.14.1. Coeficiente de Eficiência Alimentar.....	30
6.2.14.2. Quociente de Eficiência Protéica.....	30
6.2.14.3. Digestibilidade Aparente.....	31
6.2.15. Análise estatística.....	31
<b>CAPÍTULO III.....</b>	<b>32</b>

ARTIGO 1 – RESPOSTA NUTRICIONAL, BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA DE RATOS <i>Wistar</i> ALIMENTADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE <i>Spirulina</i> .....	33
ARTIGO 2 – INFLUÊNCIA DE DIETAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE <i>Spirulina</i> NO DESENVOLVIMENTO CORPORAL E PERFIS LIPÍDICO E GLICÍDICO DERATOS <i>Wistar</i> .....	55
ARTIGO 3 – <i>Spirulina</i> COMO FONTE PROTÉICA NA RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL DE RATOS <i>Wistar</i> .....	70
<b>CAPÍTULO IV.....</b>	<b>90</b>
<b>7 CONCLUSÃO GERAL.....</b>	<b>91</b>
<b>CAPÍTULO V.....</b>	<b>92</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....</b>	<b>93</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>104</b>
APÊNDICE 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS.....	105



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Perfil de aminoácidos (%) da <i>Spirulina</i> LEB-18, soja integral e valores estipulados pela FAO ( <i>Food and Drug Agriculture Organization</i> ).....	14
Tabela 2. Perfil de ácidos graxos (%) na microalga <i>Spirulina</i> LEB-18.....	16
Tabela 3. Composição das dietas controle (C), aprotéica (A) e experimentais com diferentes concentrações de <i>Spirulina</i> (S1, S2 e S3).....	23

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Unidade piloto de produção de <i>Spirulina</i> no município de Santa Vitória do Palmar, RS – Brasil.....	6
Figura 2. Fotografia microscópica da microalga <i>Spirulina</i> .....	10
Figura 3. Processo de obtenção da <i>Spirulina</i> pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB/FURG).....	20
Figura 4. Biomassa seca de <i>Spirulina</i> LEB18 antes (a) e após (b) trituração e peneiramento.....	21
Figura 5. Ilustração da elaboração das dietas.....	24
Figura 6. <i>Pellets</i> das dietas controle (a), aprotéica (b), <i>Spirulina</i> S1 (c), <i>Spirulina</i> S2 (d) e <i>Spirulina</i> S3 (e).....	25
Figura 7. Experimento em execução no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Ciência de Alimentos -UFPeI.....	26
Figura 8. Etapas do ensaio <i>in vivo</i> com <i>Spirulina</i> LEB-18.....	27

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Cálculo do Coeficiente de eficiência.....	30
Equação 2. Cálculo do quociente de eficiência protéica.....	31
Equação 3. Cálculo da digestibilidade aparente.....	31

# **CAPÍTULO I**

## RESUMO

*Spirulina* é uma cianobactéria que vem sendo produzida e estudada devido suas propriedades nutricionais e benéficas à saúde. Atualmente, a Legislação brasileira recomenda, como limite máximo de consumo diário por pessoa, 1,6g de *Spirulina* (BRASIL, 2009). O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o efeito de dietas adicionadas de diferentes concentrações de *Spirulina* LEB-18 sobre os perfis bioquímicos, hematológicos, nutricionais e fisiológicos de ratos machos da linhagem *Rattus norvegicus* cepa *Wistar*/UFPel. Atendendo todas as necessidades bioclimatológicas, tanto de micro como macro ambientes, o bioensaio, aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Pelotas – UFPel (processo nº 23110.008077/2009-22) foi conduzido na Sala de Experimentação Animal do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFPel. O experimento foi realizado durante 45 dias, sendo os 5 primeiros para adaptação dos animais ao ambiente e à dieta controle e os demais para a realização, em paralelo, de dois experimentos (I e II). No experimento “I”, com duração de 40 dias, os animais (n=24) foram distribuídos em 4 tratamentos, conforme dieta ofertada: C (caseína como fonte protéica); S1 (1,6g *Spirulina*/dia); S2 (3,2g *Spirulina*/dia); e S3 (4,8g *Spirulina*/dia). No experimento II, durante 10 dias, os animais (n=23) receberam uma dieta aprotéica (A). Posteriormente foram redistribuídos em 4 grupos (C, S1, S2 e S3) para recuperação nutricional durante 30 dias. No decorrer e ao término do experimento foram observados peso dos animais e ingestão diária de dieta; coletados materiais biológicos, como, excretas, sangue e órgãos para posteriores determinações. Dentre as concentrações estudadas, a S1, caracterizada pelo limite descrito pela ANVISA, apresentou melhores resultados. Apesar de algumas diferenças entre os tratamentos adicionados de *Spirulina*, a microalga mostrou-se eficaz ao desenvolvimento dos animais e não causou reações adversas, conforme determinações, condições e período de realização desta pesquisa.

Palavras-chave: avaliação nutricional; níveis bioquímicos; perfil hematológico; ratos *Wistar*; *Spirulina*.

## ABSTRACT

*Spirulina* is a cyanobacteria that has been produced and studied for its nutritional properties and health benefits. Presently, Brazilian legislation recommends a maximum consumption limit of 1.6g of *Spirulina* daily per person (BRAZIL, 2009). This study has the general objective of evaluating the effect of diets supplemented with different concentrations of *Spirulina* LEB-18 on biochemical profiles, hematologic, nutritional and physiological characteristics of male rats of the classification *Rattus norvegicus* strain *Wistar*/UFPEl. Given all the bioclimatological needs, both micro and macro environments, the bio-assay, approved by the Ethics Committee of Pelotas Federal University (UFPEL) (processo nº 23110. 008077/2009-22), was conducted in the Hall of Animal Experimentation at the Department of Food Science, UFPEL. The study was carried out over 45 days, with the first 5 days for the adaptation of the animals to the environment and dietary control. Over the remaining 40 days, two experiments (I and II) were carried out in parallel. In experiment "I", lasting 40 days, the animals (n=24) were distributed into the following 4 groups of diet preparation offered: C (casein as a protein source); S1 (1,6g *Spirulina*/day); S2 (3,2g *Spirulina*/day); and S3 (4,8g *Spirulina*/day). In experiment "II", lasting 10 days, the animals (n=23) received an aprotic diet (A). Afterwards, they were distributed into four groups offered the diet preparations C, S1, S2 and S3 cited above, for nutritional recovery lasting 30 days. In the course of the experiment and at the end, animal weight and daily dietary intake were observed; biological materials, (such as feces, blood and organs), were collected for subsequent analysis. Amongst the concentrations studied, the S1 group, characterised by the limit described by ANVISA, showed better results. Despite some differences amongst the groups, supplementation with *Spirulina* microalgae proved effective for animal development and caused no adverse reactions, as prescribed within the conditions and duration of this research.

Keywords: evaluation nutritional; *in vivo* test; biochemical levels; blood levels; *Wistar* rats; *Spirulina*.

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Respeitando-se cada vez mais as questões sociais e ambientais, nos últimos anos grande interesse tem sido focado no potencial biotecnológico de microalgas, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos, que têm potencial de uso na alimentação humana. A imensa biodiversidade e conseqüente variabilidade na composição bioquímica da biomassa obtida, aliadas ao emprego de melhoramento genético e ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala, vêm permitindo que determinadas espécies sejam comercialmente utilizadas.

Cianobactérias são organismos fotossintéticos, os quais crescem em meio líquido e se reproduzem rapidamente, podendo multiplicar sua biomassa em períodos de 24h, gerando compostos biologicamente ativos (BURJA et al., 2001). Conforme Rosa, Carvalho & Goldbeck (2005) a principal microalga estudada e produzida devido suas propriedades nutricionais e benéficas à saúde é a *Spirulina*, também conhecida como *Arthrospira*. Segundo Cohen (1997) e Colla; Muccillo-Baisch & Costa. (2008) esta cianobactéria apresenta composição apropriada de proteínas, ácidos graxos poliinsaturados e vitaminas, além de compostos antioxidantes, podendo ser utilizada na alimentação humana.

Muitas investigações indicam que a insuficiência protéica na nutrição humana é um dos problemas dos países subdesenvolvidos, por isso, é necessário aumentar e diversificar as fontes de proteínas e desenvolver novas fontes não convencionais (CARVAJAL, 2009). Nesse sentido, as microalgas, em especial a *Spirulina*, apresentam-se como alternativa no aporte desses nutrientes. Atualmente, a Universidade Federal do Rio Grande, em especial, o Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, desenvolvem pesquisas acerca do cultivo de microalgas, como também o seu aproveitamento na alimentação humana.

Ao analisar estudos disponíveis, pode-se observar que, entre 1990 e 2000, a produção mundial de *Spirulina* passou de 710 toneladas para mais de 3.300 toneladas. Carvajal (2009) refere-se às estatísticas industriais da FAO (*Food and Agriculture Organization*) as quais descrevem que no ano de 2003 a China produziu 19.080 toneladas de *Spirulina*, aumentando para 41.570 toneladas em 2004.

Segundo a FDA (*Food and Drug Administration*, 2003) a *Spirulina* é classificada como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), o que garante seu uso

como alimento sem riscos à saúde. Esta classificação é devido a diversas pesquisas que avaliaram as propriedades nutricionais da microalga, assim como a sua inocuidade (FÉVRIER & SÉVE, 1976; BOUDÉNE et al., 1976; KRISHNAKUMARI et al., 1981; CIFERRI, 1983; JASSBY, 1988). Desde então a FDA sugere que a ingestão diária deva ser de acordo com o aporte físico do consumidor, podendo variar de 0,1 a 6g e a estimativa média de consumo é 3g/indivíduo/dia (FDA, 2003). No Brasil, desde 2009 a *Spirulina* passou a ser considerada como novo alimento/ingrediente e seu consumo diário é limitado pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) a 1,6g/indivíduo (BRASIL, 2009).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Verificar o efeito da ingestão diária de diferentes quantidades de *Spirulina* na dieta, sendo escolhido como concentração mínima o limite estabelecido pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), em ratos *Wistar*.

### 2.2. Objetivos específicos

Avaliar o desenvolvimento corporal de ratos *Wistar* alimentados com diferentes concentrações de *Spirulina*;

Analisar as respostas nutricionais dos animais frente a diferentes concentrações de *Spirulina* na ingesta diária;

Avaliar índices hematológicos dos animais alimentados com diferentes concentrações de *Spirulina*;

Estudar o efeito de diferentes concentrações de *Spirulina* nos índices bioquímicos destes animais;

Verificar o efeito de diferentes concentrações de *Spirulina* na recuperação nutricional de ratos;

Comparar o efeito de dietas com diferentes concentrações de *Spirulina* em animais sadios e desnutridos.

### 3 JUSTIFICATIVA

Atualmente, no Brasil, a coexistência de duas situações contrárias tem chamado a atenção de pesquisadores: a desnutrição e a obesidade. No primeiro caso observa-se o atraso no crescimento, susceptibilidade a doenças e desenvolvimento, em geral, alterado. No outro extremo, crianças com sobrepeso e ainda assim susceptíveis a doenças e desenvolvimento inadequado. Em relação ao primeiro caso, uma das estratégias de entidades filantrópicas e públicas para amenizar o problema é a implementação de projetos de bioprodutos regionais na alimentação humana.

A fim de suprir essa demanda, o Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da FURG realiza pesquisas acerca do cultivo de microalgas com enfoque na fixação de CO<sub>2</sub> e no aproveitamento da biomassa microalgal para fins alimentícios. Dentre estas microalgas está a *Spirulina*, a qual se desenvolve naturalmente na região sul do Rio Grande do Sul. Embora os estudos em relação a essa microalga tenham crescido, a produção da *Spirulina* no Brasil está muito aquém da sua capacidade potencial, pois geralmente são iniciativas de caráter experimental. Como consequência disso, a microalga comercializada principalmente na forma de fármacos é importada de outros países a um preço elevado.

A *Spirulina* é estudada há muitos anos, tendo uma longa e documentada história de consumo humano. Nos últimos 20 anos, tem sido comercializada e consumida como um alimento seguro por milhões de pessoas nas Américas do Norte e do Sul, Ásia, Europa, Austrália e África. Além disso, a *Spirulina* foi aprovada como um alimento para consumo humano por muitos governos, bem como pelas agências de saúde e associações de mais de 70 países, dentre eles Argentina, Estados Unidos, Austrália, Índia e China.

Através da comprovação da inocuidade da *Spirulina* por diversas pesquisas, a FDA (*Food and Drug Administration*) certificou esta microalga como GRAS (*Generally Recognized as Safe*). A base para esta determinação foram pesquisas científicas realizadas por *Cyanotech Corporation* (Havaí) e *Earthrise Nutritionals* (Califórnia). Nestes estudos, a *Spirulina* foi adicionada a diversos alimentos e bebidas, consumida em quantidades de 0,1 a 6g/indivíduo/dia (FDA, 2003).

Em maio de 2009 a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) incluiu a *Spirulina* na lista de Novos Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, estabelecendo como limite um consumo máximo de 1,6g microalga/indivíduo/dia, quantidade essa inferior às permitidas por outras nações. Para registro de novos ingredientes ou alimentos pela ANVISA é necessário seguir um protocolo, onde a avaliação da segurança de uso de novos ingredientes/alimentos é conduzida com base na documentação apresentada pela empresa interessada, conforme disposto no item 5 da Resolução n. 17/1999.

A Resolução nº 17 de maio de 1999 dispõe de informações sobre a Avaliação de Segurança e Comprovação de Eficácia. O registro de alimentos com alegações e a avaliação de novas alegações devem ser realizados mediante a comprovação de segurança de uso e eficácia, atendendo aos critérios estabelecidos por esta resolução (BRASIL, 1999).

Embora atribua-se destacada importância nutricional à *Spirulina* devido à variedade de macro e micronutrientes que contém, o elevado conteúdo de ácidos nucléicos (RNA e DNA) nesta microalga pode ser fator limitante para seu uso como alimento, pois a degradação de parte de seus componentes termina na produção de ácido úrico, os quais podem precipitar e formar cristais de urato de sódio, resultando em extrema sensibilidade das articulações (gota) e depósito de pedras nos rins, como demonstrado ou evidenciado em algumas pesquisas.

Considerando as inúmeras pesquisas em andamento com *Spirulina*, destaque àquelas direcionadas ao seu cultivo, obtenção, aplicação em alimentos, e principalmente as controvérsias em torno da quantidade segura a ser ingerida, buscou-se verificar o efeito do consumo diário no nível máximo estabelecido pela ANVISA e em 2 níveis superiores, usando ratos como modelo experimental.

#### 4 ESTUDOS NUTRICIONAIS SOBRE *Spirulina*

A Universidade Federal do Rio Grande (FURG) é um dos mais importantes centros de estudos multidisciplinares sobre ecossistemas costeiros do Brasil e América do Sul. Contribui, assim, com o conhecimento sobre este ambiente e suas inter-relações, respeitando o homem como peça chave dentro deste sistema. O Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos vêm se dedicando há mais de 14 anos ao desenvolvimento de tecnologias e produtos que agreguem valor e contribuam para o desenvolvimento sustentável da sociedade. Dentro do programa, o Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB) da Escola de Química e Alimentos da FURG possui uma estrutura dedicada ao estudo do cultivo de microalgas desde 1996, realizando pesquisas acerca da produção e utilização da biomassa microalgal.

A partir de uma parceria do Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG, com as organizações não governamentais Fundação ZERI do Brasil e Antenna Technology, a empresa Amana Key Educação e Desenvolvimento, as prefeituras de Santa Vitória do Palmar e Rio Grande, a Fundação Banco do Brasil e as empresas COPESUL e Refinaria de Petróleo Ipiranga foi construída e posta em operação uma unidade piloto de produção de *Spirulina*, no município de Santa Vitória do Palmar, às margens da Lagoa Mangueira (Fig. 1), com o objetivo de utilizar a água da Lagoa no cultivo da microalga e tornar-se um centro de referência nacional do cultivo de *Spirulina*.



Figura 1. Unidade piloto de produção de *Spirulina* no município de Santa Vitória do Palmar, RS - Brasil.

Fonte: LEB-FURG, 2010.

Atualmente esta unidade produz cerca de 50 kg de *Spirulina* mensais que deverão ser, em breve, adicionados à merenda escolar na região (LEB-FURG, 2010). Dentre os estudos relacionados aos fatores nutricionais e funcionais da *Spirulina* desenvolvidos pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica estão: Colla (2002), que avaliou a influência das condições de crescimento sobre o potencial antioxidante de *S. platensis* e seu potencial na redução da hipercolesterolemia; Guarienti (2009) avaliou o potencial antioxidante da microalga *Spirulina* frente a condições de estresse oxidativo e Carvalho (2010), que desenvolveu novos alimentos para praticantes de atividade física, adicionados ou não de *Spirulina*.

Em relação a estudos *in vivo* com *Spirulina* são diversos os trabalhos realizados por variados países. Na França, México, Itália, Japão e Índia, entre 1970 e 1990, foram realizados diversos estudos para a avaliação da inocuidade da *Spirulina*. Estes estudos não apresentaram resultados indesejáveis, nem efeitos tóxicos em ratos e porcos, mesmo quando a microalga constituiu uma parcela significativa da proteína dietética (FÉVRIER & SÉVE, 1976; KRISHNAKUMARI et al., 1981; CIFERRI, 1983; JASSBY, 1988). Estudo a longo prazo (8 meses) com ratos não revelaram toxicidade ou efeitos adversos (BOUDENE et al., 1976). Em 1980, um dos estudos de maior importância com *Spirulina* utilizando ratos e camundongos foi patrocinado pela ONUDI (*United Nations Industrial Development Organization*). Neste estudo a *Spirulina* foi incorporada ao alimento em quantidades de 10 a 35%, não havendo problemas com a segunda ou terceira geração (FDA, 2003).

Um teste de intoxicação crônica com *Spirulina* foi realizado no Japão em ratos *Wistar* de ambos os sexos durante seis meses. Animais foram alimentados *ad libitum* com dietas controle e *Spirulina*, ambas com 20% de proteína. Ao término do estudo o peso, aparência, crescimento e histologia de órgãos (cérebro, coração, estômago, fígado, baço, rins, testículos ou ovários e glândulas adrenais) não foram significativamente diferentes entre os grupos (YOSHINO et al. 1980).

Alves, Vontarelli & Mello (2005) verificaram a eficiência da *Spirulina* na recuperação nutricional de ratos *Wistar* desnutridos. Estes autores verificaram que a microalga mostrou-se eficaz na reversão de alterações induzidas pela restrição alimentar. Marco (2008) avaliou a biodisponibilidade de nutrientes em multimisturas acrescidas de *Spirulina*. Ratas *Wistar* foram alimentadas com diferentes multimisturas, dentre elas uma dieta adicionada de *Spirulina*, a qual proporcionou um bom desempenho frente à dieta padrão..

**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO DA LITERATURA**  
**MATERIAL E MÉTODOS**

## 5 REVISÃO DA LITERATURA

### 5.1. Cianobactérias e biotecnologia

A utilização de micro-organismos e de seus produtos metabólicos pelo homem é um dos campos mais expressivos da biotecnologia. É muito importante o conhecimento da atividade destes micro-organismos na conversão de determinadas substâncias em outras, como também da possibilidade do uso de substratos para obtenção de produtos e subprodutos viáveis (COLLA, 2002).

O crescente interesse em cianobactérias, fungos e bactérias deve-se à essencial importância destes nas diversas cadeias tróficas e na possibilidade da aplicação comercial em distintas áreas como na nutrição, saúde humana e animal, no tratamento de águas residuais, na produção de energia e na obtenção de compostos de interesse das indústrias alimentícia, química e farmacêutica, dentre outras.

As cianobactérias ou algas cianofíceas são organismos pertencentes ao reino Monera. São procariontes tendo, portanto, o material genético disperso na célula (DERNER, 2006). São micro-organismos fotossintéticos, os quais crescem em meio líquido e se reproduzem rapidamente, podendo multiplicar sua biomassa em períodos de 24h, gerando compostos biologicamente ativos, como proteínas. O interesse no cultivo destes organismos fundamenta-se em suas variadas e possíveis aplicações tais como alimentação, produção de energia química, extração de pigmentos entre outras substâncias celulares de interesse industrial e no tratamento de águas residuárias (BURJA et al., 2001).

O interesse na exploração das cianobactérias para produção em larga escala para alimentação humana deve-se também à sua alta taxa de crescimento, resultando em elevada produção de nutrientes, particularmente proteínas, e à capacidade de utilizarem como substrato fontes energéticas de baixo custo, como resíduos agroindustriais. Estes aspectos determinam vantagens tecnológicas e comerciais em relação a técnicas convencionais de produção de proteína (ANUPAMA & RAVINDRA, 2000).

Segundo Radmann & Costa (2008) existem diversos métodos para capturar CO<sub>2</sub> liberado por indústrias e usinas termoelétricas, destacando-se a utilização de microalgas. Com a utilização de CO<sub>2</sub> as microalgas se multiplicam e

produzem uma série de compostos de interesse, como proteínas, ácidos graxos e corantes. Além desse processo que favorece a preservação do meio ambiente, as microalgas contribuem também no tratamento de efluentes e, ao se reproduzirem nesse meio, aumentam sua biomassa, a qual pode ser utilizada como fonte de alimentação e/ou de extração de biocompostos.

## 5.2. Cianobactéria *Spirulina*

A microalga *Spirulina* (Fig. 2) é uma cianobactéria filamentosa que forma tricomas cilíndricos multicelulares com 1 a 12 $\mu$ m de diâmetro e se dispõem em forma espiralada, atingindo até 1mm de comprimento. Através da fotossíntese a *Spirulina* converte os nutrientes do meio em material celular, liberando oxigênio (COLLA, 2002). A *Spirulina* tem envoltório celular mais parecido com uma bactéria do que com uma alga, ou seja, suas paredes celulares são mais digeríveis uma vez que são formadas por mucopolissacarídeos e não por celulose, o que representa vantagem do ponto de vista de preservação da integridade de componentes, como vitaminas e ácidos graxos poliinsaturados (TOMASELLI, 1993).

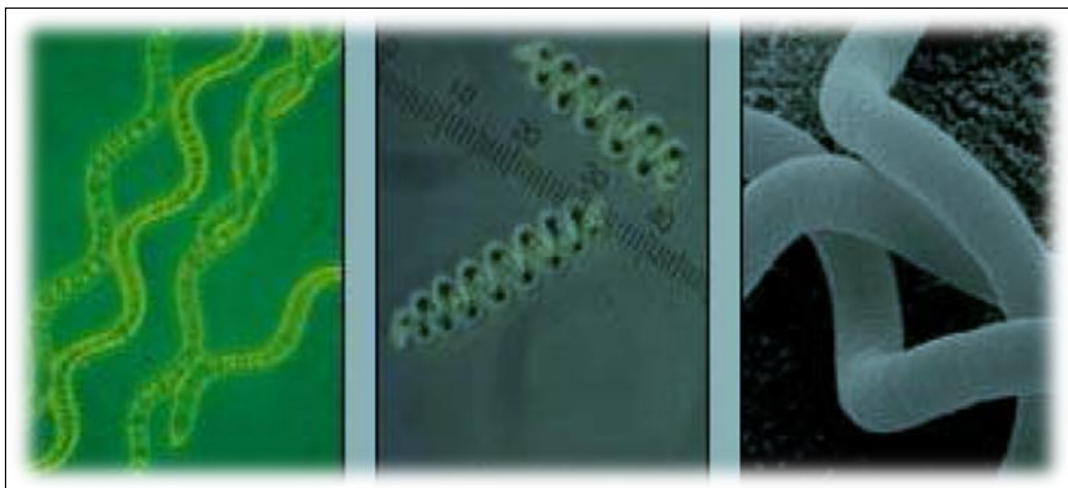


Figura 2. Fotografia microscópica da microalga *Spirulina*

Fonte: SHIMAMATSU, 2004.

Essa microalga apresenta-se como uma alternativa na produção de biomassa alimentar em regiões áridas com escassez de água por responder bem à radiação solar intensa e altas temperaturas, crescer em águas alcalinas e com alta salinidade (8,5 a 200g.L<sup>-1</sup>). É essencialmente fotoautotrófica, isto é, através da



fotossíntese, obtém energia da luz para a fixação de carbono necessário à construção de biomassa. Como subproduto da reação, a microalga libera oxigênio na atmosfera (CHRONAKIS et al., 2001).

### **5.2.1. Legislação para *Spirulina***

*Spirulina* é um produto totalmente de origem biológica. Consiste na biomassa seca da cianobactéria *Arthrospira platensis*, considerada com GRAS, podendo ser adicionada em alimentos preparados na quantidade de 0,5-3g/porção (FDA, 2003).

Em maio de 2009 a *Spirulina* passou a fazer parte da Lista de Novos Ingredientes (enquadrada nos Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos) aprovada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a qual limita a sua ingestão diária em 1,6g por indivíduo (BRASIL, 2009).

### **5.2.2. Condições de crescimento e cultivo**

No meio ambiente, seja em lagos ou vias fluviais, o crescimento da microalga *Spirulina* pode ser afetado pela contaminação de outras algas de pouco interesse, o que pode ser evitado por sistemas de lagoas especialmente projetados e condições controladas (MULITERNO et al., 2005). Segundo Derner (2006) para um crescimento ótimo as microalgas têm necessidade de uma série de nutrientes, sendo que a quantidade requerida depende do microrganismo em estudo. Quanto aos macronutrientes, requerem carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e fósforo, além de cálcio, magnésio, enxofre e potássio. Como micronutrientes, geralmente requerem ferro, manganês, cobre, molibdênio e cobalto, enquanto algumas microalgas também necessitam baixas concentrações de vitaminas no meio de cultura.

Existem diversos meios para o cultivo da *Spirulina*, dentre eles o Zarrouk (1996) é o meio mais utilizado para o preparo e manutenção do inóculo na fermentação. Este é composto por:  $\text{NaHCO}_3$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ;  $\text{NaNO}_3$ ;  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ;  $\text{NaCl}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CaCl}_2$ ; EDTA; solução A<sub>5</sub> e B<sub>6</sub>. A solução A<sub>5</sub> possui  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ;  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{CuCO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{MnO}_3$ ; e a solução B<sub>6</sub> contém  $\text{NH}_4\text{VO}_3$ ;

$\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{TiOSO}_4$ ;  $\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ ;  $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ .

O cultivo de microalgas para a obtenção de biomassa e de seus produtos de síntese é uma atividade industrial estabelecida em escala comercial em alguns países como China, Índia, Austrália e Israel (FDA, 2003). Em geral, os sistemas de produção industrial são pouco sofisticados, uma vez que muitas empresas desenvolvem cultivos a céu aberto em tanques com fundo de terra e com baixo ou nenhum controle dos parâmetros ambientais (BOROWITZKA, 1999; DERNER, 2006).

No Brasil, a produção da microalga em nível experimental tem se tornado freqüente devido à necessidade de pesquisas visando o desenvolvimento e o aperfeiçoamento dos sistemas de produção. O cultivo otimizado da *Spirulina* é realizado em escala laboratorial em biorreatores, estimulando assim a produção de compostos de interesse comercial e conhecimento sobre as variáveis de crescimento (RANGEL, 2000; ANDRADE & COSTA, 2008).

Segundo Derner (2006), a escolha do meio de cultivo depende dos produtos de interesse (biomassa, ácidos graxos, pigmentos, etc.) que as microalgas podem sintetizar naquelas condições de meio cultivo. Estudos mostraram que a composição da biomassa da *S. platensis* varia conforme os ciclos claro/escuro aos quais a mesma é submetida. No período iluminado ocorre a síntese dos carboidratos em detrimento à proteína, durante o período escuro as proteínas são sintetizadas a partir dos carboidratos (TOMASELLI, 1993).

Para o emprego na elaboração de alimentos, bem como para a extração de alguma substância de interesse, depois de transcorrida a fermentação é necessário separar a biomassa do meio de cultura. O processo de separação envolve uma ou mais operações sólido:líquido, como floculação, centrifugação e filtração, por exemplo. Em seguida, a biomassa é desidratada; para tanto, podem ser empregadas diversas técnicas, como secagem ao sol, *spray-drying* e liofilização.

Para extração dos compostos, as células microalgais são rompidas, empregando-se métodos de homogeneização, ultra-som, choque osmótico, solventes, enzimas, etc. As substâncias de interesse são então recuperadas e, na maioria dos casos, sofrem algum processo de purificação como ultrafiltração, cromatografia ou fracionamento. Esses parâmetros de produção não são fixos, eles

dependem não só do biorreator utilizado como também do objetivo da pesquisa (DERNER, 2006).

### 5.2.3. Aspectos nutricionais

Atribui-se grande importância nutricional à *Spirulina* devido à variedade de macro e micronutrientes que contém. Pode-se dizer que a *Spirulina* é um alimento com maior variedade de nutrientes por unidade de peso, sendo que 20g desta microalga são suficientes para satisfazer as necessidades nutricionais do organismo humano. Estudos demonstraram que esta cianobactéria apresenta teor protéico em torno de 60% de proteína bruta além de vitaminas, minerais e diversas substâncias bioativas (PHANG, 2000).

A utilização da *Spirulina* na alimentação deve-se à sua composição química, que por sua vez, proporciona efeitos nutricionais e potencialmente funcionais ao consumidor (MORAIS, 2006). Conforme a FDA (2003) esta microalga apresenta em sua constituição 53-62% de proteínas; 17-25% de carboidratos; 4-6% de lipídios; 8-13% de minerais e 3-6% de umidade.

As proteínas são compostas por carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Frequentemente enxofre e fósforo e algumas vezes outros elementos, como ferro (na hemoglobina) e o iodo (na tiroxina) são incorporados à sua molécula. Elas são essenciais para formação de células; produção de hormônios, enzimas e outras substâncias que iniciam e controlam processos fisiológicos básicos.

A qualidade protéica pode ser expressa pelo perfil aminoacídico de um alimento, balanço de nitrogênio, valor biológico, digestibilidade, entre outros parâmetros (ZEPKA, 2008). As proteínas das algas, de um modo geral, são pouco absorvidas quando utilizadas na alimentação humana e de animais. Contudo, as microalgas, principalmente a *Spirulina*, apresentam alta digestibilidade sem requerer processamentos especiais (CARVAJAL, 2009). Além disso, sua parede celular é constituída por polissacarídeos, apresentando uma digestibilidade em torno de 86% (BECKER, 2004).

De acordo com Deman (1981) e Carvajal (2009) as proteínas da *Spirulina* contêm todos os aminoácidos essenciais. Relativamente a estes aminoácidos, contudo, apresentam maior valor quando comparadas a cereais. O perfil de aminoácidos da *Spirulina* encontrado por Morais et al. (2009) é satisfatório, pois os

percentuais de aminoácidos presentes na cianobactéria estão próximos aos padrões estabelecidos pela FAO, além disso mostram-se muito superiores a outros alimentos, como soja e feijão (Tab. 1).

Tabela 1. Perfil de aminoácidos (%) da *Spirulina* LEB-18, soja integral e valores estipulados pela FAO (*Food and Agriculture Organization*)

Aminoácido (% w/w)		LEB-18 <sup>1</sup>	SOJA <sup>2</sup>	FAO <sup>3</sup>
Essenciais	Leucina	8,02	1,87	6,60
	Fenilalanina	5,75	2,99	*
	Arginina	4,94	1,57	*
	Treonina	4,87	1,06	3,40
	Valina	4,61	1,94	3,50
	Isoleucina	4,36	0,98	2,80
	Lisina	2,95	2,29	5,80
	Histidina	2,72	2,74	1,90
	Triptofano	2,53	*	1,10
Semi essenciais	Metionina	1,64	0,54	*
	Cistina	0,47	*	*
	Tirosina	3,20	*	*
Não essenciais	Ácido glutâmico	10,70	*	*
	Glicina	5,17	*	*
	Serina	4,31	*	*
	Prolina	4,04	*	*
	Ácido aspártico	9,20	*	*
	Alanina	6,51	*	*

<sup>1</sup> Valores obtidos por Morais et al. (2009);

<sup>2</sup> Valores obtidos por Rodrigues et al. (2002);

<sup>3</sup> Valores preconizados pela FAO para crianças com idade de 2 a 5 (MORAIS et al., 2009);

\* Dados não encontrados na literatura pesquisada.

Apesar de seu elevado teor protéico as microalgas não ganharam importância significativa na alimentação humana, a qual é dependente da aprovação de regulamentos de novos alimentos. Becker (2007) relata ainda que características como textura e consistência da biomassa seca, de cor verde escura e ligeiro odor de peixe contribuem com a baixa utilização pela indústria alimentícia.

Lipídios são macronutrientes constituídos por carbono, hidrogênio e oxigênio, apresentando às vezes fósforo e nitrogênio. A fração lipídica de uma dieta é nutricionalmente importante pois contém ácidos graxos essenciais, além de servir de transporte das vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) e ser o macronutriente que fornece maior quantidade de energia.

Os ácidos graxos essenciais, importantes do ponto de vista nutricional, não são sintetizados pelo organismo humano pela ausência de dessaturases específicas, responsáveis pela formação das duas insaturações nestes compostos, devendo então ser introduzidos na dieta (LEHNINGER; NELSON e COX, 2006). A essencialidade de ácidos graxos, como o linoléico e o linolênico, está relacionada ao fato de serem precursores das prostaglandinas, substâncias que controlam numerosas funções no organismo humano (RICHMOND, 1990).

Dentre os ácidos graxos presentes na *Spirulina* encontram-se em maior proporção o ácido palmítico, o linoléico e o oléico (BECKER, 2004). Pesquisas realizadas por Colla (2002), Sánchez et al. (2003) e Bertolin et al. (2009) relatam a expressiva presença do ácido gama-linolênico (GLA). Este ácido graxo essencial está relacionado ao tratamento e prevenção de várias doenças. O ácido linoléico constitui em média 25% dos ácidos graxos poliinsaturados presentes na microalga e contribui na redução de colesterol no sangue, podendo auxiliar na redução do risco da ocorrência de doenças cardiovasculares. A Tabela 2 apresenta o perfil de ácidos graxos da *Spirulina* LEB-18 determinado em estudo realizado por Radmann & Costa (2008).

Segundo Becker (2004) a *Spirulina* apresenta vitaminas A e C, importantes antioxidantes naturais, e ácido fólico (B<sub>9</sub>), o qual é necessário para a formação de células e bom funcionamento de alguns órgãos. Esta microalga destaca-se, sobretudo, pelo seu conteúdo de vitamina B<sub>12</sub>, difícil de encontrar em dietas vegetarianas. De acordo com Jassby (1988), apenas 1,8g de *Spirulina* alcançaria o valor de RDA (*Recommend Dietary Allowances*) para a vitamina B<sub>12</sub>, importante fator para a formação das células vermelhas do sangue.

Em relação aos minerais, zinco, magnésio, cromo, selênio e ferro estão presentes na biomassa (BECKER, 2004). Segundo Jassby (1988) a quantidade de ferro destaca-se em relação aos demais. O mesmo autor relata que 12g de *Spirulina* seriam suficientes para suprir as necessidades do mineral no organismo. Conforme dados dispostos por FDA (2003) cada 3g de *Spirulina* contém 1,3mg de ferro.

Tabela 2. Perfil de ácidos graxos na microalga *Spirulina* LEB-18

Ácidos graxos					
Saturados (%)		Monoinsaturados (%)		Poliinsaturados (%)	
C 15:0	0,08	C 14:1	0,26	C 18:2	2,71
C 16:0	2,54	C 15:1	1,26	α - C 18:3	7,61
C 17:0	1,92	C 16:1	41,02	γ - C 18:3	18,12
C 18:0	0,33	C 17:1	2,45	C 20:2	0,08
C 20:0	12,60	C 18:1	8,04	C 20:3	0,36
C 22:0		C 20:1	0,14	C 20:4	0,49
C 23:0		C 24:1		C 20:5	
C 24:0				C 22:2	
				C 22:6	

Fonte: RADMANN & COSTA, 2008.

Quanto aos pigmentos presentes nesse microrganismo, a clorofila, os carotenóides e a ficocianina, caracterizados respectivamente pelas cores verde, laranja-amarelado e azul, apresentam capacidades distintas de absorver luz em determinados comprimentos de onda. Esses pigmentos atuam na captação de luz para a realização da fotossíntese. De toda a radiação eletromagnética que incide sobre os organismos fotossintetizantes, somente o espectro visível, isto é, com comprimento de onda entre 400 e 720nm pode ser absorvido pelos pigmentos fotossintéticos (DERNER, 2006).

Os carotenóides são hidrocarbonetos de natureza terpênica, portanto formam um grupo de substâncias com estrutura insaturada. São um grupo de pigmentos naturais (responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha) solúveis em solventes orgânicos. O β-caroteno é um carotenóide encontrado na *Spirulina* e em outras algas, estando em maior concentração nas algas verdes. Este pigmento é conhecido como pró-vitamina A, já que é convertido em retinol (vitamina A). Possui atividade antioxidante, sendo um dos principais carotenóides que neutralizam os radicais livres (RAMÍREZ, 2006).

### 5.3. Testes toxicológicos para proteína unicelular

Biomassas microalgais possuem elevados teores de ácidos nucléicos, os quais têm sido relatados como cerca de 4-6% (JASSBY, 1988). Os ácidos nucléicos (AN) são despolimerizados por nucleases do suco pancreático e convertidos em nucleosídeos por enzimas intestinais de absorção. Após absorvidas, as bases púricas guanina e adenina são metabolizadas, no homem e outras espécies monogástricas, a ácido úrico. O elevado consumo de purinas resulta no aumento dos níveis plasmáticos e excreção renal do ácido úrico, que por ser pouco solúvel nos fluidos fisiológicos, pode precipitar-se nos tecidos e articulações, propiciando o aparecimento da gota, como também a presença de cristais nos rins e bexiga (KILHBERG, 1972).

Estudos feitos com dietas isentas de purinas e adicionadas de quantidades variáveis de algas e leveduras permitiram estabelecer correlação existente entre níveis de ácidos nucléicos na dieta e concentração sérica de ácido úrico, bem como a sua excreção urinária (FERREIRA-PINTO & ARAÚJO-NETO, 1972). Após diversas pesquisas, PAG (1975) concluiu que um limite de ingestão diária de 2g de ácidos nucléicos provenientes de proteína unicelular não representa riscos à saúde humana. Contudo, cabe considerar que o RNA e seus produtos de degradação constituem substâncias valiosas para a pesquisa bioquímica e fisiológica, principalmente na área da medicina e nutrição (CABALLERO-CÓRDOBA, 1997).

A determinação da proteína em micro-organismos é obtida multiplicando-se o teor de nitrogênio total obtido pelo fator 6,25, assumindo que a proteína contém 16% de nitrogênio, o que seria válido para um alimento de composição conhecida. Isto porém é discutível para os micro-organismos uma vez que no nitrogênio total inclui-se o nitrogênio não protéico proveniente dos ácidos nucléicos, bases nitrogenadas e pequenas porções de outros constituintes (BRESSANI, 1986).

Experiências realizadas em testes nutricionais de curto e longo prazo, usando animais de laboratório, têm demonstrado que a ingestão de micro-organismos em pequena quantidade, aparentemente segura, pode vir a induzir reações adversas como náuseas, desconforto e hipersensibilidade em humanos. Estes fatos foram determinantes para o estabelecimento de uma série de procedimentos para avaliação da segurança de alimentos com fontes protéicas não

convencionais. Dentre estes procedimentos encontra-se o teste de toxicidade aguda, realizado através das respostas de ratos, camundongos, entre outros animais de laboratório, em tempo médio de 2 semanas (CABALLERO-CÓRDOBA, 1997).

Durante os experimentos devem ser observados os efeitos do alimento em estudo sobre o crescimento, consumo de dieta e outros determinantes do valor nutricional da proteína, aspecto físico (postura, locomoção, olhos, narinas e região anal) e das excretas. Entre as análises clínicas sugeridas está a determinação bioquímica do sangue (glicose, lipídios, proteínas plasmáticas, substâncias nitrogenadas não protéicas, enzimas, etc.); teste de função hepática (aminotransferases); reflexos neurológicos; eletrocardiograma; eletroencefalograma e exame histológico dos órgãos (CABALLERO-CÓRDOBA, 1997).

As proteínas plasmáticas são elementos celulares essenciais, constituídas de aminoácidos unidos por ligações peptídicas. Sabe-se que há uma grande diversidade de proteínas séricas com funções específicas e distintas que, em conjunto, atuam na manutenção da pressão osmótica do plasma, defesa e transporte de moléculas. Sua avaliação fornece importantes dados acerca de condições clínicas como o estado de hidratação, existência de doenças inflamatórias e metabolismo protéico, podendo a sua diminuição em animais saudáveis ser um indicativo de restrição no aporte de aminoácidos, seja pelo consumo de dietas pobres em proteína, seja pela ingestão de alimentos com conteúdo protéico satisfatório, mas contendo fatores que dificultam os processos de digestão e absorção (CAMPELLO et al., 2009).

A uréia é a principal forma excretora do nitrogênio proveniente do catabolismo protéico. É sintetizada no fígado a partir da amônia, liberada na desaminação dos aminoácidos. Se essencialmente toda a uréia formada no corpo humano é sintetizada no fígado, na ausência do mesmo ou na presença de alguma doença hepática grave, a amônia se acumula no sangue. O nível de uréia no sangue é notadamente afetado pela função renal, pelo conteúdo protéico exógeno e pelo catabolismo das proteínas (MILLER, 1993).

A creatina é sintetizada no fígado, rins e pâncreas e transportada para as células musculares e cérebro, onde é fosforilada a creatina-fosfato. Tanto a creatina quanto a creatina-fosfato, em condições fisiológicas, perdem espontaneamente água ou seu radical fosfato, respectivamente, para formar seu anidro, a creatinina. A



creatinina, produzida no músculo, é removida do plasma por filtração glomerular, sendo excretada pela urina (MILLER, 1993).

O ácido úrico é o principal produto final do metabolismo das purinas em humanos. Os nucleotídeos das purinas são degradados até obtenção da hipoxantina, que por sua vez é oxidada sucessivamente à xantina, formando posteriormente o ácido úrico. Como resultados da contínua renovação das substâncias contendo purinas, quantidades de ácido úrico são constantemente formadas e excretadas. O ácido úrico do plasma é filtrado pelos glomérulos, sendo cerca de 90% reabsorvido e pequenas quantidades eliminadas pela urina. O aumento da urecemia pode ocorrer por redução da excreção renal ou pelo excesso de produção do ácido úrico (MILLER, 1993; CABALLERO-CÓRDOBA, 1997).

As enzimas aspartato aminotransferase (AST ou TGO) e alanina aminotransferase (ALT ou TGP) são essencialmente sintetizadas na presença de vitaminas do complexo B. Estas enzimas catalizam reações de grande importância para a síntese e degradação de aminoácidos (GUYTON, 1984). Ainda, conforme citação de Córdoba & Sgarbieri (2000), a relação AST/ALT pode dar uma idéia do grau de lesão do hepatócito. Uma relação inferior a 1,0 sugere lesão citoplasmática do hepatócito (hepatite infecciosa aguda, mononucleose infecciosa, obstruções extra-hepáticas), já quando a relação é superior a 1,0 revela lesões citoplasmáticas mitocondriais do hepatócito (cirrose, esteatose, injúrias produzidas por drogas, hepatite crônica).

## 6 MATERIAL E MÉTODOS

### 6.1. Material

#### 6.1.1. Biomassa microalgal

A microalga utilizada no presente trabalho foi *Spirulina* cepa LEB-18/FURG, isolada da Lagoa Mangueira. Sua produção é realizada na Planta Piloto localizada as margens da Lagoa Mangueira (33° 30' 13" S e 53° 08' 59" W) em Santa Vitória do Palmar, RS. A unidade consiste de 3 tanques abertos tipo *raceway* de 10.000L e 1 tanque aberto tipo *raceway* de 1.000L para propagação do inóculo. Os cultivos são protegidos por túnel de filme transparente com proteção contra raios UV e expostos a condições ambientais naturais. Quando a microalga atinge a concentração 0,50g.L<sup>-1</sup>, sua biomassa é separada através de filtração e seca em secador de bandejas a 50°C por 5h (MORAIS et al., 2008). A Figura 3 exibe o processo de obtenção da microalga desde o cultivo até armazenamento.



Figura 3. Processo de obtenção da *Spirulina* pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica (LEB/FURG).

Fonte: LEB-FURG, 2010.

#### 6.1.2. Modelos biológicos

Foram utilizados 47 *Rattus norvegicus* cepa *Wistar*/UFPeI, machos, recém desmamados (21 dias), gerados e criados no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), com peso inicial variando entre 42 e 72g, e peso médio de 70g.

### 6.1.3. Ingredientes para elaboração das dietas

Caseína, L-cistina, cloridrato de colina, minerais, mistura vitamínica (manipulação farmacêutica), óleo de soja, sacarose, farelo de trigo e amido de milho foram adquiridos no comércio local. A mistura de minerais (Reeves et al., 1993) foi obtida através da pesagem e homogeneização dos minerais adquiridos.

## 6.2. Métodos

O experimento foi realizado durante o período de setembro de 2009 a maio de 2010. Sendo parte realizada no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFPel e parte no Laboratório de Ciência de Alimentos da Escola de Química e Alimentos da FURG.

### 6.2.1. Preparo da biomassa

A biomassa de *Spirulina* LEB-18 foi triturada em moinho de facas (Modelo Laboratory Mill 3100, Perten®) e peneirada em agitador de peneiras, alcançando uma granulometria de 40mesh. Após foi acondicionada a vácuo em embalagens de polietileno de alta densidade (PEAD), com capacidade para 500g, e armazenada à temperatura ambiente ( $\pm 22^{\circ}\text{C}$ ). A Figura 4 exibe a microalga antes e após processo de trituração.



Figura 4. Biomassa seca de *Spirulina* LEB-18 antes (a) e após (b) trituração e peneiramento.

Fonte: O autor, 2010.

### 6.2.2. Determinação da composição proximal da biomassa

A biomassa triturada foi homogeneizada e uma alíquota retirada para posterior análise. As determinações de umidade, cinzas, fibra bruta e proteínas foram realizadas, em triplicata, conforme métodos oficiais descritos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2000). O teor de lipídios totais foi determinado, em triplicata, através do método de Bligh & Dyer (1959) adaptado por Araújo (2009).

### 6.2.3. Formulação das dietas

Foram preparadas cinco dietas (Tab. 3) conforme as recomendações de Reeves et al. (1993) para atender as necessidades nutricionais de roedores em crescimento (AIN93G):

- Dieta controle (C): caseína comercial (>85% de proteína);
- Dieta aptotéica (A): sem adição de fonte protéica;
- Dieta S1: 8,8% (w/w) de *Spirulina* (1,6g *Spirulina*/20g de dieta/animal/dia);
- Dieta S2: 17,6% (w/w) de *Spirulina* (3,2g *Spirulina*/20g de dieta/animal/dia);
- Dieta S3: 26,4% (w/w) de *Spirulina* (4,8g *Spirulina*/20g de dieta/animal/dia).

A formulação da dieta controle (C), apesar da recomendação de ingestão de 20% de proteínas para roedores em crescimento, foi calculada a fim de apresentar 10% deste nutriente, pois de acordo com Miller & Bender (1995) e Sgarbieri (1996) fontes protéicas apresentam maior utilização por roedores nesta quantidade. É importante salientar que para obtenção da dieta C com 10% de proteína foram adicionados 120g de caseína já que essa não se apresentava pura (>85% de proteína), o restante dos ingredientes conforme preconizado por Reeves et al. (1996) e o amido de milho adicionado para completar 1000g de dieta. A dieta aptotéica (A) foi formulada a partir da controle (C), retirando-se a caseína e complementando-se com mais amido de milho.

Tabela 3. Composição das dietas controle (C), aprotéica (A) e experimentais com diferentes concentrações de *Spirulina* (S1, S2 e S3)

Ingredientes	Dietas (g.k <sup>-1</sup> )				
	C	A	S1 <sup>1</sup>	S2 <sup>1</sup>	S3
<i>Spirulina</i> LEB-18 (56% proteína; 7,4% lipídios; 10,7% cinzas; 9,5% fibra)	-	-	88,0	176,0	264,0
Caseína (>85% de proteína)	120,0	-	50,5	1,5	-
Óleo de soja	70,0	70,0	63,5*	57,0*	50,5*
Mistura de minerais <sup>2</sup>	35,0	35,0	25,5*	16,0*	6,5*
Mistura de vitaminas <sup>2</sup>	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
L- cistina	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Farelo de trigo	50,0	50,0	43,5*	37,0*	30,5*
Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Amido de milho <sup>3</sup>	609,5	729,5	613,5	597,0	533,0

<sup>1</sup>Para obtenção de 10% de proteína, valor mínimo necessário ao desenvolvimento de roedores, as dietas experimentais S1 e S2 foram suplementadas com caseína;

<sup>2</sup>Preparado conforme AIN-93G (Reeves et al., 1993);

<sup>3</sup>Adicionado para completar a dieta;

\*Descontada a quantidade intrínseca da microalga.

As dietas C, S1, S2 e S3 foram calculadas para apresentarem-se isoprotéicas (10%). Para elaboração das dietas S1, S2 e S3 o cálculo baseado na composição proximal da biomassa, na quantidade de ingestão diária por roedores (SOUZA-SOARES; MACHADO & RODRIGUES, 2009) e no limite estabelecido pela ANVISA como consumo máximo diário de *Spirulina*:

- 20g de dieta/dia/rato;
- 1,6g de *Spirulina*/20g de dieta (dieta S1);
- 80g de *Spirulina*/1000g de dieta;
- 88g de *Spirulina*/1000g de dieta (10% adicionado devido perdas durante consumo);
- Ajuste de fontes de lipídios (7%), fibras (5%) e minerais (3,5%) conforme quantidade intrínseca da biomassa;
- Demais dietas com *Spirulina* (S2 e S3) foram formuladas conforme o mesmo procedimento.

#### 6.2.4. Preparo das dietas

Todas as dietas foram preparadas semanalmente conforme consumo dos animais. Inicialmente pesaram-se os ingredientes individualmente, misturando-os conforme quantidade descrita na formulação (ordem crescente) para que houvesse melhor homogeneização e então adicionou-se um gel com 8% de amido para umedecimento até obtenção de uma massa de consistência firme, adequada à peletização. Essa massa foi submetida a fracionamento manual em pequenas porções a fim de se obterem os *pellets*, os quais foram dispostos em tabuleiros gradeados de aço-inox e então levados à estufa com circulação de ar a  $50\pm 1^\circ\text{C}/24\text{h}$  (SOUZA-SOARES, MACHADO & RODRIGUES, 2009). Após secagem as dietas foram armazenadas à temperatura ambiente em recipientes vedados de polipropileno, para distribuição aos respectivos grupos de animais. As figuras 5 e 6 exibem esquema para elaboração das dietas peletizadas e as dietas C; S1; S2 e S3, respectivamente.

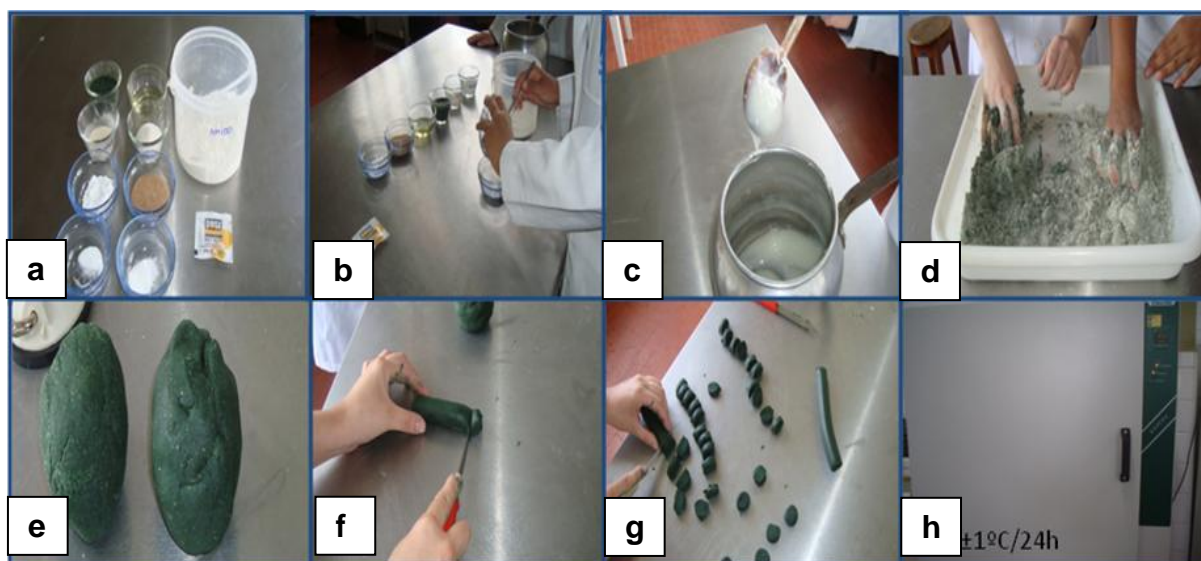


Figura 5. Ilustração da elaboração das dietas. a Esquema para elaboração das dietas peletizadas. (a) pesagem dos ingredientes; (b) homogeneização dos ingredientes secos; (c) elaboração do gel com 8% de amido; (d) umidificação da massa seca com gel de amido; (e) massa pronta para peletização; (f,g) peletização manual dos *pellets*; (h) secagem dos *pellets* em estufa como circulação de ar a  $50^\circ\text{C}/24\text{h}$ .

Fonte: O autor, 2010.



Figura 6. *Pellets* das dietas controle (a), aprotéica (b), *Spirulina* S1 (c), *Spirulina* S2 (d) e *Spirulina* S3 (e).

Fonte: O autor, 2010.

Controle (C): caseína comercial (>85% de proteína);

Aprotéica (A): sem adição de fonte protéica;

S1: 8,8% (w/w) de *Spirulina* (1,6g *Spirulina*/20g de dieta/animal/dia);

S2: 17,6% (w/w) de *Spirulina* (3,2g *Spirulina*/20g de dieta/animal/dia);

S3: 26,4% (w/w) de *Spirulina* (4,8g *Spirulina*/20g de dieta/animal/dia).

#### 6.2.5. Determinação da composição proximal das dietas

As dietas foram analisadas em triplicata, quanto aos percentuais de umidade, cinzas, fibra bruta e proteínas (AOAC 2000). O teor de lipídios totais foi determinado, em triplicata, conforme adaptação do método de Bligh & Dyer (1959) descrita por Araújo (2009).

#### 6.2.6. Experimentação *in vivo*

Atendendo todas as necessidades bioclimatológicas, tanto de micro como macro ambientes, o bioensaio foi conduzido na Sala de Experimentação Animal do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFPel (Fig. 7) de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, durante o período de 07 de dezembro de 2009 a 21 de janeiro de 2010. O protocolo para a condução do ensaio biológico (processo nº 23110. 008077/2009-22), foi aprovado pela Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Pelotas (Apêndice 1).



Figura 7. Experimento em execução no Laboratório de Experimentação Animal do Departamento de Ciência de Alimentos – UFPel.

Fonte. O autor, 2010.

Os 47 animais, após sorteio dos grupos, foram mantidos em gaiolas metabólicas de arame galvanizado (2 animais/gaiola), com tela coletora de fezes, funil coletor de urina, comedouro externo tipo cesta em arame galvanizado, e bebedouro de polipropileno com capacidade para 300mL. Durante o experimento o laboratório permaneceu sob condições de claro/escuro (fotoperíodo de 12h) e temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) controladas, como também sob renovação de ar por sistema de exaustão. Além disso, em paralelo ao procedimento semanal de pesagem dos animais, mudou-se a disposição vertical e horizontal de cada gaiola [Exemplo: gaiola inicialmente localizada na lateral esquerda da prateleira superior foi redistribuída para a lateral direita da próxima prateleira abaixo] a fim de melhor distribuição de luz e ruídos presentes no ambiente e conseqüentemente diminuir fatores ambientais causadores de estresse.

O ensaio *in vivo* foi conduzido durante 45 dias (Fig. 8), dos quais os primeiros 5 dias foram para adaptação dos animais às condições do ambiente e à dieta controle para roedores em crescimento. Ao final do período de adaptação os animais foram pesados e redistribuídos por sorteio em cinco grupos: Controle (n=6); Aprotéica (n=23); S1 (n=6); S2 (n=6) e S3 (n=6), tendo-se o cuidado em manter o peso médio dos grupos de maneira que a diferença entre os mesmos fosse a mínima possível. Diariamente, no período da manhã, cada grupo recebeu 20g da sua respectiva dieta em forma de *pellets* durante 40 dias, a exceção do grupo



aprotéico. Este grupo consumiu a respectiva dieta aprotéica durante 10 dias e após esse período foi redistribuído por sorteio, tendo-se o cuidado de manter a homogeneidade de peso corporal entre os grupos, passando a consumir as dietas: C (n=6); S1 (n=5); S2 (n=6) e S3 (n=6). Durante todo o experimento os animais receberam água *ad libitum*.

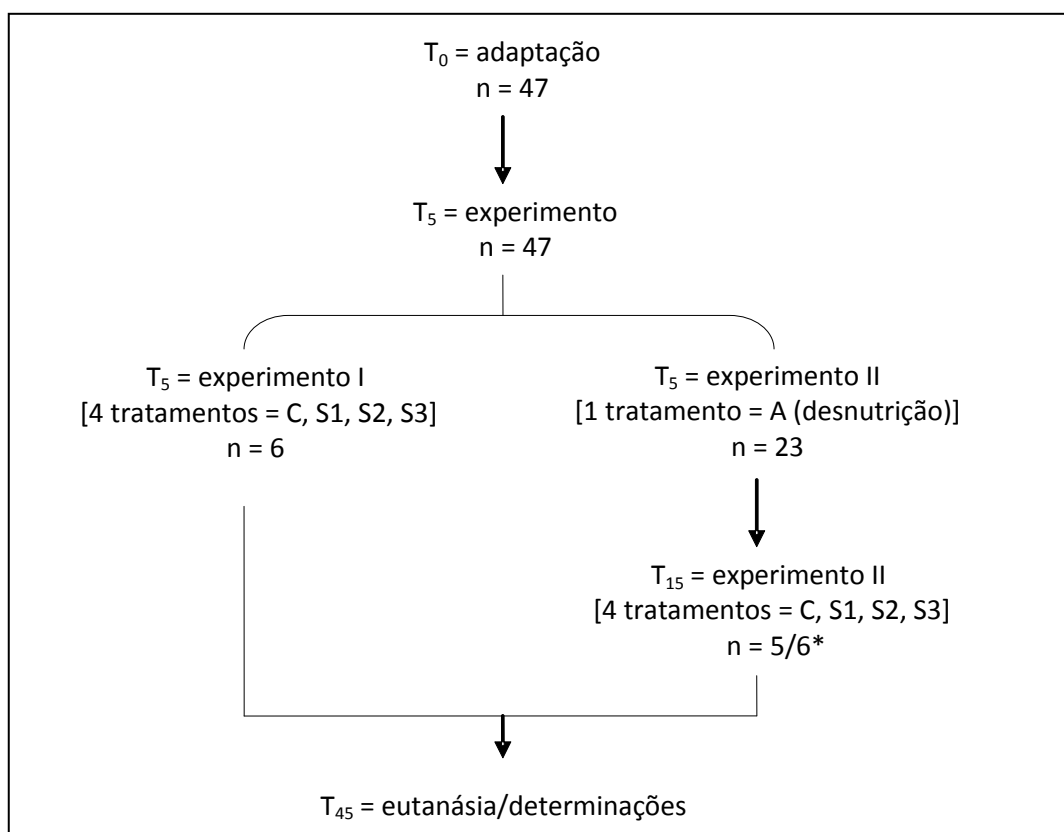


Figura 8. Etapas do ensaio *in vivo* com *Spirulina* LEB-18.

Fonte: O autor, 2010.

$t_0$ : adaptação dos 47 animais ao ambiente durante 5 dias consecutivos;

$t_5$ : período experimental, onde experimento I e II foram realizados em paralelo até  $t_{45}$ .

$t_5$ (experimento I): 24 animais foram alimentados com 4 diferentes dietas (n = 6) durante 40 dias consecutivos;

$t_5$ (experimento II): 23 animais foram alimentados com dieta aprotéica durante 10 dias consecutivos até  $t_{15}$ ;

$t_{15}$ : 23 animais do experimento II foram distribuídos alimentados com 4 dietas diferentes durante 30 dias consecutivos;

$t_{45}$ : término do período experimental;

n: corresponde ao número de animais por tratamento.

\*O Tratamento S1 apresentou n = 5.

### 6.2.7. Parâmetros ponderais e biológicos dos animais

No decorrer do experimento foi realizada, diariamente, pesagem da dieta remanescente com o objetivo de se determinar a quantidade diária de ingesta por animal. O peso corporal dos animais foi registrado a cada 7 dias para avaliação do ganho de peso semanal dos mesmos. Estes dados, além de expressarem o ganho de peso e a ingestão de dieta por animal, são utilizados para determinar o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) (SILVA, 2009).

### 6.2.8. Avaliações bioquímicas

Ao final do experimento (45 dias), após os animais serem submetidos a um jejum de 12h, foi realizada uma sedação em câmara com éter etílico, sendo feita coleta de sangue por punção cardíaca em seringa descartável de 10mL com agulha heparinizada de 25x7mm (22Gx1"). Uma alíquota de sangue foi destinada à determinação da glicose sanguínea ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ), realizada imediatamente em glicosímetro ACCUTREND GCT (Laboratórios Roche do Brasil®) o qual fornece a dosagem direta de glicose no sangue.

Parte do sangue foi acondicionada em tubos de ensaio sem anticoagulante e então centrifugada a 1000g durante 15min a 4°C, objetivando a obtenção do soro, o qual foi congelado a -18°C (ARAUJO, 2009). Posteriormente as amostras foram avaliadas em avaliador bioquímico LabMax 240 (LABTEST DIAGNÓSTICA S.A.®) quanto aos teores dos minerais magnésio, fósforo e cálcio, expressos em  $\text{mg.dL}^{-1}$ , e ferro ( $\mu\text{g.dL}^{-1}$ ); albumina e proteínas totais ( $\text{g.dL}^{-1}$ ); creatinina; uréia; ácido úrico e as frações lipídicas HDL-colesterol, LDL-colesterol, VLDL-colesterol, colesterol total e triacilgliceróis, expressos em  $\text{mg.dL}^{-1}$ . Outra fração sanguínea foi acondicionada em tubos *ependorf* com anticoagulante EDTA para determinação de índices hematológicos.

### 6.2.9. Determinações hematológicas

O sangue com EDTA foi imediatamente encaminhado ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Pelotas, para

realização dos hemogramas em contador hematológico automático (POCH-100iVDiFF, SYSMEX®). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada por microscopia ótica de esfregações sanguíneas coradas (Panóptico rápido, LABORCLIN®).

#### **6.2.10. Medidas antropométricas**

Logo após o procedimento de eutanásia e antes da retirada de órgãos, foi realizada, com auxílio de fita métrica, a determinação do comprimento vértice-cóccix (focinho até a ponta da cauda), comprimento entre os membros torácicos, e também, da circunferência do abdômen de cada animal (ÁGUILA; APFEL & MANDARIM-DE-LACERDA 1997; ARAÚJO, 2009). As medidas foram expressas em cm.

#### **6.2.11. Obtenção do fígado e gordura corporal**

Em cada animal foi feito um corte ventral longitudinal para retirada do fígado e da gordura corporal. Este material foi lavado em solução fisiológica (NaCl 0,9%) gelada, enxuto em papel filtro e pesado em balança analítica (capacidade de 200g e precisão de 0,01g). Os procedimentos realizados para a remoção da gordura corporal dos animais consistiram em remover as gorduras mesentérica, renal e inguinal. Os resultados foram expressos em g.

#### **6.2.12. Tratamento das carcaças**

Posteriormente à eutanásia, as carcaças dos animais foram armazenadas em saco branco leitoso (BRASIL, 2003) e congeladas para então serem recolhidas e incineradas por empresa especializada contratada pela UFPEL, bem como todos os materiais perfurocortantes.

#### **6.2.13. Avaliação das fezes**

A cada dois animais foram coletadas as fezes durante os sete últimos dias do experimento, totalizando uma amostra (amostra = *pool* das fezes de 2

animais). Como em cada tratamento o número de animais era igual a seis (n=6), obteve-se três amostras de fezes por tratamento. Estas amostras foram pesadas em balança analítica (capacidade de 200g e precisão de 0,01g), secas em estufa a  $50\pm 1^\circ\text{C}$  por 48h, empacotadas em papel alumínio e armazenadas a  $-18^\circ\text{C}$  até o momento da análise (SILVA, 2009).

#### 6.2.13.1. Determinação de lipídios

As fezes secas foram moídas em almofariz com ajuda de pistilo e alíquotas de 3g das fezes de cada amostra foram pesadas. A determinação foi realizada, em triplicata, através do método de Bligh & Dyer (1959) adaptado por Araújo (2009). Os resultados foram expressos em % lipídios.

#### 6.2.13.2. Determinação de proteínas

O teor protéico de cada amostra foi determinado através do método de Kjeldahl, sendo os resultados expressos em % de proteína (AOAC, 2000). O fator de conversão protéico utilizado para todas as amostras foi de 6,25.

### 6.2.14. Avaliação da qualidade nutricional das dietas

Para avaliação nutricional das dietas foram determinados os Coeficientes de Eficiência Alimentar (CEA), Quociente de Eficiência Protéica (PER) e Digestibilidade Aparente (DA), conforme Sgarbieri (1996).

#### 6.2.14.1. Coeficiente de Eficiência Alimentar

Calculado através da relação entre o ganho de peso total dos animais e a ração total consumida, conforme apresenta a Equação 1.

$$\text{CEA} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{ração consumida (g)}} \quad (1)$$

**Equação 1.** Cálculo do Coeficiente de Eficiência Alimentar

#### 6.2.14.2. Quociente de Eficiência Protéica

Obtido conforme a Equação 2, a qual relaciona o ganho de peso total dos animais e a quantidade de proteína consumida (Equação 2).

$$\text{PER} = \frac{\text{ganho de peso (g)}}{\text{proteína consumida (g)}} \quad (2)$$

**Equação 2.** Cálculo do Quociente de Eficiência Protéica

#### 6.2.14.3. Digestibilidade Aparente

A digestibilidade aparente das proteínas e/ou lipídios foi determinada através da Equação 3.

$$\text{DA} = \frac{\text{proteína/lipídio ingerido (g)} - \text{proteína/lipídio excretado (g)}}{\text{proteína/lipídio ingerido (g)}} \times 100 \quad (3)$$

**Equação 3.** Cálculo da Digestibilidade Aparente

#### 6.2.15. Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos em média  $\pm$  desvio-padrão e submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e aplicado o teste de Tukey para comparação das médias, considerando o nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ). Sendo utilizado para estas o *software* Statistica 7.0 (StatSoft®, 2004).

**CAPÍTULO III**  
**DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO**

## ARTIGO 1 - RESPOSTA NUTRICIONAL, BIOQUÍMICA E HEMATOLÓGICA DE RATOS *Wistar* ALIMENTADOS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *Spirulina*

O objetivo desta pesquisa foi avaliar o valor nutritivo da cianobactéria *Spirulina* LEB-18, produzida no sul do Brasil, e seus possíveis efeitos adversos em relação ao consumo de elevados teor de proteína (60-70%) e de ácidos nucléicos (cerca de 4%) presentes neste tipo de biomassa. A cianobactéria foi avaliada durante 40 dias através de respostas nutricionais, obtidas pelo desenvolvimento de ratos *Wistar*, como também por meio do estudo bioquímico do soro e hematológico do sangue destes animais. Para obtenção destes dados foram preparadas quatro dietas isoprotéicas (12% proteína): 1) Dieta controle (AIN93G); 2) Dieta S1, 8,8%(w/w) de *Spirulina*; 3) Dieta S2, 17,6%(w/w) de *Spirulina*; 4) Dieta S3, 26,4%(w/w) de *Spirulina* e distribuídas aos animais de acordo com o respectivo tratamento (n=6). Quanto aos parâmetros nutricionais o tratamento S1 mostrou-se mais eficiente. Os grupos não diferiram em relação às respostas bioquímicas no soro, com exceção do S2, que apresentou níveis de creatinina inferiores aos demais. No perfil hematológico o tratamento S3 apresentou níveis de hematócrito e hemoglobina maiores ( $p \leq 0,05$ ) que a dieta controle. Estes resultados não revelaram efeitos adversos devido ao consumo da microalga, como também sugerem o uso de *Spirulina* como fonte potencial de proteína unicelular.

Palavras-chave: avaliação nutricional; cianobactéria; ensaio *in vivo*; ratos *Wistar*; *Spirulina*.

### INTRODUÇÃO

O uso da proteína unicelular (SPC), ou seja, células secas de microorganismos, como leveduras, bactérias e microalgas (ZEPKA et al., 2010), na alimentação humana é frequente há milhares anos. Nas últimas décadas a engenharia bioquímica tem se dedicado ao desenvolvimento de novos métodos de processamento para fins alimentícios. As cianobactérias, atualmente cultivadas em sistemas de grande escala, são fontes economicamente viáveis de proteína para uso na alimentação, pois muitas vezes

atendem aos requisitos desse nutriente na dieta e, além disso, através delas é possível obter outros produtos destinados ao consumo humano (KUHAD et al., 1997).

Cianobactérias como fonte de proteína unicelular tem certas vantagens sobre a utilização frente a outros micro-organismos devido ao seu rápido crescimento e quantidade e qualidade da proteína (MOLINA; BELARBI & ACIÉN-FERNANDEZ, 2002). Dentre essa está a do gênero *Spirulina* (*Arthrospira*), que contém cerca de 60 a 70% das proteínas, ácidos nucléicos e aminoácidos recomendados pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) (PELIZER; DANESI & RANGEL, 2003). Contém ainda beta-caroteno e ferro absorvível, além de outros minerais e altos níveis de vitaminas, compostos fenólicos, ácido gama-linolênico e outros ácidos graxos essenciais (BELAY; MIYAKAWA & SHIMAMATSU, 1993; VON DER WEID; DILLON & FALQUET, 2000).

Atualmente no Brasil a *Spirulina* é classificada como novo ingrediente e seu consumo diário não deve ultrapassar 1,6g/indivíduo (BRASIL, 2009). No entanto o FDA (*Food and Drug Administration*), após classificar esta microalga como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), sugere que a ingestão diária deva ser de acordo com o aporte físico do consumidor, podendo variar de 0,1 a 6g e a estimativa média de consumo é 3g/indivíduo/dia (FDA, 2003). Segundo Becker (2007), entre os fatores que limitam o uso de proteína unicelular na alimentação humana está a presença da parede celular, a qual pode influenciar na digestibilidade e absorção, e ainda o alto conteúdo de ácidos nucléicos, cuja degradação leva à produção de ácido úrico, que pode precipitar e formar cristais de urato de sódio, resultando em extrema sensibilidade das articulações e depósito de pedras nos rins, como demonstrado ou evidenciado em algumas pesquisas.

O grande interesse na utilização da *Spirulina* como fonte alternativa de proteína levou o grupo a estudar a ação dessa microalga no organismo de ratos *Wistar*, constantemente utilizados em pesquisas hormonais, psicológicas, imunológicas e nutricionais. O objetivo da pesquisa foi avaliar o valor nutritivo e possíveis efeitos adversos de diferentes níveis de ingestão diária da microalga *Spirulina*, utilizando ratos como modelo experimental.



## MATERIAL E MÉTODOS

### Biomassa microalgal

Foi utilizada a microalga *Spirulina* cepa LEB-18, produzida pela Universidade Federal do Rio Grande, Brasil (MORAIS et al., 2008).

### Modelos biológicos

24 *Rattus norvegicus* Wistar/UFPel, machos, recém desmamados (21 dias), com peso médio de 70g, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas, Brasil (UFPel) foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n=6), sendo alojados em gaiolas de arame galvanizado.

### Dietas

Foram preparadas quatro dietas seguindo as determinações da AIN-93G (Reeves et al.,1993), com teor protéico ajustado para 10%, sendo as fontes protéicas: 1) Dieta controle (C): caseína comercial; 2) Dieta S1: 8,8%(w/w) de *Spirulina*; 3) Dieta S2: 17,6%(w/w) de *Spirulina*; 4) Dieta S3: 26,4%(w/w) de *Spirulina* (Tabela 1). A formulação da dieta controle (C), apesar da recomendação de ingestão de 20% de proteínas para roedores em crescimento, foi calculada a fim de apresentar 10% deste nutriente (MILLER & BENDER, 1995; SGARBIERI, 1996; JOOD & SINGH, 2001). É importante salientar que para obtenção da dieta C com 10% de proteína foram adicionados: 120g de caseína já que essa não se apresentava pura (>85% de proteína), o restante dos ingredientes conforme preconizado por Reeves et al. (1996) e o amido de milho adicionado para completar 1000g de dieta. Para formulação das dietas S1, S2 e S3 o cálculo foi baseado na composição proximal da biomassa (Tab.1), na quantidade de ingestão diária por roedores (20g/rato/dia) (SOUZA-SOARES; MACHADO & RODRIGUES, 2009) e no limite estabelecido pela ANVISA como consumo máximo diário de *Spirulina* (1,6g/indivíduo/dia) (BRASIL, 2009).

Tabela 1. Composição das dietas Controle (C), S1 (8,8% de *Spirulina*), S2 (17,6% de *Spirulina*) e S3 (26,4% de *Spirulina*)

Ingredientes (g.kg <sup>-1</sup> )	Dietas/Tratamentos			
	C	S1 <sup>1</sup>	S2 <sup>1</sup>	S3
<i>Spirulina</i> LEB-18 (56% proteína; 7,4% lipídios; 10,7% cinzas; 9,5% fibra)	-	88,0	176,0	264,0
Caseína (>85% de proteína)	120,0	50,5	1,5	-
Óleo de soja	70,0	63,5*	57,0*	50,5*
Mistura de minerais <sup>2</sup>	35,0	25,5*	16,0*	6,5*
Mistura de vitaminas <sup>2</sup>	10,0	10,0	10,0	10,0
L- cistina	3,0	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Farelo de trigo	50,0	43,5*	37,0*	30,5*
Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0
Amido de milho <sup>3</sup>	609,5	613,5	597,0	533,0

<sup>1</sup>Para obtenção de 10% de proteína, valor mínimo necessário ao desenvolvimento de roedores, as dietas experimentais S1 e S2 foram suplementadas com caseína;

<sup>2</sup>Preparado conforme AIN-93G (Reeves et al., 1993);

<sup>3</sup>Adicionado para completar a dieta;

\*Descontada a quantidade intrínseca da microalga.

### Métodos analíticos

A composição proximal da biomassa e das dietas foi determinada conforme métodos descritos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2000), com exceção de lipídios totais, os quais foram determinados por método de Bligh & Dyer (1959). As fezes dos animais foram avaliadas quanto ao teor de nitrogênio total (AOAC, 2000).

### Experimento *in vivo*

O experimento foi realizado durante 45 dias, sendo os 5 primeiros para adaptação dos animais ao ambiente. O laboratório permaneceu sob condições de luz (fotoperíodo de 12h) e temperatura (22±2°C) controladas, como também sob renovação de ar por sistema de exaustão. As dietas foram ofertadas diariamente (20g/rato), assim como a sua pesagem remanescente para determinação da ingesta diária. O peso corporal dos animais foi registrado a cada 7 dias para avaliação do

ganho de peso. A execução do experimento seguiu as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Pelotas – RS, Brasil (processo nº 23110. 008077/2009-22).

#### Avaliação nutricional

Foram realizadas as seguintes determinações para avaliação da qualidade das dietas em estudo: Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), dado pela razão entre o ganho de peso e a quantidade total de dieta ingerida durante o experimento; Quociente de Eficiência Protéica (PER), calculado através da razão entre ganho de peso e a quantidade total de proteína consumida e Digestibilidade Protéica Aparente ( $DA_{\text{protéica}}$ ), obtida através do cálculo:  $[\text{nitrogênio ingerido} - \text{nitrogênio excretado nas fezes} / \text{nitrogênio ingerido}] \times 100$  (SGARBIERI, 1996).

#### Análise hematológica e bioquímica

Ao término do experimento, após os animais serem submetidos a um jejum de 12h, foi realizada sedação em cânula com éter etílico, sendo imediatamente feita coleta de sangue por punção cardíaca. Cerca de 1mL do sangue foi disposto em *ependorf* com anticoagulante EDTA e destinado para análise de hemograma em contador hematológico automático (POCH-100iVDiFF, SYSMEX®); o restante centrifugado a 1000g x 15 min a 4°C em tubos de ensaio para obtenção do soro que foi armazenado a -18°C (LEMOS, 1999) para posterior análise em avaliador bioquímico LabMax 240 (LABTEST DIAGNÓSTICA S.A.).

#### Análise estatística

Foram realizadas análises de variância (ANOVA), seguidas do teste de Tukey para comparação entre as médias num nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o *software* Statistica 7.0 (Statsoft, EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme observado na Tabela 2, não há diferença entre os tratamentos quanto aos teores de proteínas, cinzas e fibra bruta, fato desejável para a execução do experimento, uma vez que estes foram previamente estabelecidos conforme a AIN-93G. A média do teor protéico obtido entre as dietas (11,2%) é desejável, pois

apesar da recomendação de 20% de proteínas em dietas para roedores em crescimento (Reeves et al., 1993) Miller & Bender (1995), Sgarbieri (1996) e Jood & Singh (2001) preconizam que fontes protéicas apresentam maior utilização por roedores nesta quantidade. Quanto maior a concentração de proteínas na dieta menor será o Quociente de Eficiência Protéica (PER), o qual é um indicativo da sua qualidade nutricional (SGARBIERI, 1996).

Tabela 2. Composição proximal das dietas C (controle), S1 (8,8% de *Spirulina*), S2 (17,6% de *Spirulina*), S3 (26,4% de *Spirulina*)

Determinação (%)	Dietas			
	C	S1	S2	S3
Umidade	10,65±0,10 <sup>a</sup>	9,00±0,25 <sup>b</sup>	11,45±1,05 <sup>c</sup>	11,60±0,08 <sup>c</sup>
Proteína	11,40±1,40 <sup>a</sup>	10,47±0,75 <sup>a</sup>	11,58±1,40 <sup>a</sup>	11,57±0,65 <sup>a</sup>
Lipídios	7,10±0,30 <sup>a</sup>	7,40±0,10 <sup>a</sup>	7,55±0,25 <sup>a</sup>	8,00±0,30 <sup>b</sup>
Fibra bruta	4,25±0,08 <sup>a</sup>	5,36±0,10 <sup>a</sup>	5,45±0,08 <sup>a</sup>	5,50±0,10 <sup>a</sup>
Cinzas	10,60±0,07 <sup>a</sup>	10,50±0,02 <sup>a</sup>	10,75±0,01 <sup>a</sup>	10,95±0,25 <sup>a</sup>

Média de 3 repetições ±desvio padrão;

Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as dietas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Quanto ao teor de umidade algumas dietas diferiram entre si, o que provavelmente se deve a não uniformização do processo de secagem, visto que todas as dietas após peletização foram encaminhadas à estufa com circulação de ar a  $50 \pm 1^\circ\text{C}/24\text{h}$ . O teor de lipídios mostrou-se mais elevado nas dietas elaboradas com *Spirulina*, embora somente a S3 tenha apresentado níveis significativamente maiores ( $p \leq 0,05$ ). Segundo Becker (2004) os ácidos graxos correspondem à maior fração lipídica das microalgas e, em algumas espécies, os poliinsaturados representam 25 a 60% dos lipídios totais. Radmann & Costa (2008), que estudaram o conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de diferentes microalgas, encontraram 25,73% de ácido linolênico na biomassa de *Spirulina* LEB-18, entre os ácidos graxos presentes.

Ao se compararem as respostas nutricionais (Tabela 3) do tratamento controle (C) com os demais se observa que: o consumo alimentar total foi menor ( $p \leq 0,05$ ) no tratamento S1; as respostas de peso final, ganho de peso, consumo alimentar total, quociente de eficiência protéica (PER) e de digestibilidade protéica

aparente ( $DA_p$ ) do tratamento S2 foram inferiores ( $p \leq 0,05$ ); assim como a digestibilidade protéica aparente no tratamento S3.

Analisando os tratamentos com diferentes níveis de *Spirulina* observa-se que o maior consumo ocorreu no tratamento S3, evidenciando uma aceitação da microalga pelos animais ( $p < 0,05$ ). Apesar de o consumo ter sido inferior no tratamento S1, este diferiu positivamente dos demais ( $p \leq 0,05$ ) quanto ao CEA e PER, demonstrando melhor eficiência. Segundo Chaud, Sgarbieri & Vicente (2008) a redução da eficiência alimentar ocorre devido à diminuição metabólica do organismo frente à determinada dieta, causando estagnação ou redução do peso corporal. Mitchell et al. (1990), após tratarem ratos *Wistar* machos durante 60 dias para avaliar o efeito de diferentes concentrações (0%; 2,7%; 10,7%; 18,7% e 26,7%) de *Spirulina máxima* sob os níveis de vitaminas A e E constataram que o CEA foi inversamente proporcional à ingestão da biomassa. Rogatto et al. (2004) analisaram uma dieta com 17% de *Spirulina* em substituição total à proteína da dieta controle (caseína) em ratos machos jovens *Wistar* durante cinco semanas e obtiveram CEA de 0,21, valor este semelhante ao encontrado nos tratamentos com 17,6% e 26,4% de *Spirulina* (0,23 e 0,22; respectivamente) neste trabalho.

Em relação à digestibilidade da proteína microalgal observa-se que o único tratamento que se mostrou semelhante ao C foi o S1. Becker (2007), que estudou microalgas como fonte de proteína encontrou valores mais elevados para DA (83,9), no entanto valores mais baixos para PER (1,78). De acordo com Vieira & Bion (1998) proteínas originadas de diferentes fontes e usadas em diferentes proporções podem resultar em variações nas concentrações de aminoácidos limitantes, os quais interferem na sua eficiência e utilização pelo homem e animais.

Em relação à digestibilidade da proteína microalgal observa-se que o único tratamento que se mostrou semelhante ao C foi o S1. Becker (2007), que estudou microalgas como fonte de proteína encontrou valores mais elevados para DA (83,9), no entanto valores mais baixos para PER (1,78). De acordo com Vieira & Bion (1998) proteínas originadas de diferentes fontes e usadas em diferentes proporções podem resultar em variações nas concentrações de aminoácidos limitantes, os quais interferem na sua eficiência e utilização pelo homem e animais.

Tabela 3. Respostas ponderais e nutricionais de ratos *Wistar* alimentados por 40 dias com dieta C (controle), S1 (8,8% de *Spirulina*), S2 (17,6% de *Spirulina*), S3 (26,4% de *Spirulina*)

Determinação	Tratamentos			
	C	S1	S2	S3
Peso inicial (g)*	70,65±11,15 <sup>a</sup>	70,33±7,10 <sup>a</sup>	68,33±8,80 <sup>a</sup>	73,65±7,10 <sup>a</sup>
Peso final (g)	253,33±27,35 <sup>a</sup>	263,65±20,00 <sup>a</sup>	200,35±19,25 <sup>b</sup>	232,65±14,50 <sup>ab</sup>
Ganho de peso (g)	182,65±35,00 <sup>a</sup>	175,33±20,90 <sup>a</sup>	134,33±14,05 <sup>b</sup>	156,15±15,75 <sup>ab</sup>
Fígado(g)/peso corpóreo(g)	0,034±0,003 <sup>a</sup>	0,033±0,003 <sup>a</sup>	0,034±0,003 <sup>a</sup>	0,033±0,001 <sup>a</sup>
Consumo total alimentar (g)	622,10±22,30 <sup>a</sup>	573,45±26,60 <sup>b</sup>	575,85±30,25 <sup>b</sup>	654,25±24,00 <sup>a</sup>
Consumo diário <i>Spirulina</i> (g)	0	1,25	2,55	4,30
CEA	0,28±0,05 <sup>ab</sup>	0,32±0,04 <sup>b</sup>	0,23±0,04 <sup>a</sup>	0,22±0,03 <sup>a</sup>
PER	2,55±0,50 <sup>ab</sup>	2,90±0,30 <sup>b</sup>	2,00±0,25 <sup>c</sup>	2,05±0,20 <sup>ac</sup>
DA(protéica)	75,45±2,85 <sup>a</sup>	61,50±11,70 <sup>ab</sup>	43,50±11,70 <sup>c</sup>	60,30±7,45 <sup>b</sup>

Média de 6 repetições ±desvio padrão;

Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as dietas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ );

\*Após 5 dias de adaptação

CEA: coeficiente de eficiência alimentar;

PER: quociente de eficiência protéica;

DA(protéica): digestibilidade protéica aparente.

Biomassas microalgais possuem elevados teores de ácidos nucléicos, os quais têm sido relatados como cerca de 4-6%. Devido à inabilidade do organismo humano para metabolizar o ácido úrico proveniente do metabolismo das purinas, o aumento no consumo de ácidos nucléicos pode levar a altos níveis de ácido úrico no organismo, podendo promover o aparecimento de enfermidades como a gota (BECKER, 1988; ARAUJO, FACCHINETTI & SANTOS, 2003). Os valores para ácido úrico (Tabela 4), se for tomada como referência a faixa de variação 1,2 – 7,5mg.dL<sup>-1</sup> descrita como padrão para ratos (Mitruka & Rawnsley, 1981), estão todos dentro da faixa de normalidade. Da mesma forma, quando comparado a valores obtidos em outros estudos com ratos machos *Wistar* utilizados como controle, o teor de ácido úrico

foi de  $1,77\text{mg.dL}^{-1}$  (VILELA, SGARBIERI & ALVIM, 2000),  $1,40\text{mg.dL}^{-1}$  (RODRIGUES et al., 2006),  $1,48\text{mg.dL}^{-1}$  (DUARTE et al., 2009) e  $1,32\text{mg.dL}^{-1}$  (DENARDIN et al., 2009).

Não foram verificadas diferenças entre os tratamentos para os níveis de uréia, proteínas plasmáticas totais, albumina, atividade das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransaminase (ALT). A fração de nitrogênio não protéico no soro ou no sangue é composta por todas as substâncias nitrogenadas que não sejam proteínas. Seu principal componente é a uréia, a qual representa cerca de 45% do total e é o recurso mais utilizado para avaliação do funcionamento renal de mamíferos (DEVLIN, 2007). Esta é sintetizada no fígado a partir da amônia derivada predominantemente de proteínas e aminoácidos.

De acordo com Guyton (1981), a amônia liberada na desaminação de aminoácidos é quase totalmente removida do sangue mediante a conversão em uréia, então, se essencialmente toda a uréia é formada no fígado, na ausência do mesmo ou na presença de alguma doença hepática grave, a amônia se acumula no sangue. Pelo fato da *Spirulina* apresentar alto teor de nitrogênio total, a determinação de níveis séricos de uréia é importante para verificação ou não de anomalias como insuficiência renal. É preconizado por Ori, Seguro & Rocha (1990) níveis séricos de uréia em ratos em torno de  $300\text{mg.dL}^{-1}$  para que seja diagnosticada insuficiência renal, o que não ocorreu com os grupos do presente estudo. De acordo com Miller (1993), níveis baixos de uréia podem ser indicativos de insuficiência hepática grave, nefrose, desnutrição e/ou hemodiluição, o que não ocorreu neste trabalho.

Para fins de avaliação do funcionamento renal é bastante pertinente realizar a determinação dos níveis de creatinina juntamente com de uréia, pois seus níveis aumentam à medida que ocorre a diminuição do funcionamento dos rins (MILLER, 1993). Neste estudo, verificou-se que os níveis de creatinina ficaram numa faixa de  $0,34 - 0,44\text{mg.dL}^{-1}$ , não havendo diferença significativa entre os tratamentos, exceto para o S2, o qual apresenta uma quantidade intermediária de *Spirulina*.

Tabela 4. Respostas dos níveis bioquímicos do sangue de ratos *Wistar* alimentados por 40 dias com dieta C (controle), S1 (8,8% de *Spirulina*), S2 (17,6% de *Spirulina*), S3 (26,4% de *Spirulina*)

Determinação	Tratamentos			
	C	S1	S2	S3
Ácido úrico (mg.dL <sup>-1</sup> )	1,63±1,01 <sup>a</sup>	1,36±0,54 <sup>a</sup>	1,20±0,89 <sup>a</sup>	1,20±0,89 <sup>a</sup>
Uréia (mg.dL <sup>-1</sup> )	74,83±15,21 <sup>a</sup>	62,50±11,74 <sup>a</sup>	57,59±7,06 <sup>a</sup>	59,16±7,80 <sup>a</sup>
Creatinina (mg.dL <sup>-1</sup> )	0,44±0,06 <sup>a</sup>	0,44±0,05 <sup>a</sup>	0,34±0,04 <sup>b</sup>	0,42±0,07 <sup>a</sup>
Albumina (g.dL <sup>-1</sup> )	3,21±0,18 <sup>a</sup>	3,32±0,11 <sup>a</sup>	3,21±0,25 <sup>a</sup>	3,34±0,10 <sup>a</sup>
Prot. Totais (g.dL <sup>-1</sup> )	6,20±0,26 <sup>a</sup>	6,30±0,21 <sup>a</sup>	6,00±0,16 <sup>a</sup>	6,11±0,22 <sup>a</sup>
AST (U.L)	185,66±115,95 <sup>a</sup>	208,50±55,24 <sup>a</sup>	319,33±254,82 <sup>a</sup>	294,65±228,78 <sup>a</sup>
ALT (U.dL)	32,65±18,55 <sup>a</sup>	28,15±3,90 <sup>a</sup>	41,65±20,32 <sup>a</sup>	38,00±18,62 <sup>a</sup>
AST/ALT	5,60±0,35 <sup>a</sup>	7,45±1,90 <sup>a</sup>	6,85±2,85 <sup>a</sup>	7,05±3,00 <sup>a</sup>

Média de 6 repetições ±desvio padrão;

Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as dietas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ );

AST: aspartato aminotransferase;

ALT: alanina aminotransaminase.

São diversos os estudos com ratos machos *Wistar* que obtiveram valores para creatinina dentro da faixa citada anteriormente (ALVES, 2006; ANTHONY et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006). Considerações teóricas e práticas têm mostrado que a determinação de creatinina pode ser melhor empregada do que as concentrações de uréia, pois quanto mais elevados os teores de creatinina no plasma maior a excreção da mesma pelos túbulos renais (MILLER, 1993).

Sabe-se que há uma grande diversidade de proteínas séricas com funções específicas e distintas que, em conjunto, atuam na manutenção da pressão osmótica do plasma, defesa e transporte de moléculas. Sua avaliação fornece importantes dados acerca de condições clínicas como o estado de hidratação, existência de doenças inflamatórias e metabolismo protéico, podendo a sua diminuição em animais saudáveis ser um indicativo de restrição no aporte de aminoácidos, seja pelo consumo de dietas



pobres em proteína, seja pela ingestão de alimentos com conteúdo protéico satisfatório, mas contendo fatores que dificultam os processos de digestão e absorção (CAMPELLO et al., 2009).

De acordo com a literatura ratos sadios apresentam proteínas séricas entre  $5,6 - 7,5\text{g.dL}^{-1}$  e teor de albumina na faixa de  $3,4 - 4,3\text{g.dL}^{-1}$  (MORTON et al., 1993; SOUZA-SOARES, MACHADO & RODRIGUES, 2009). Os resultados obtidos estão de acordo com os encontrados por Rogatto et al. (2004), os quais verificaram a influência da ingestão de *Spirulina* sobre o metabolismo de ratos exercitados. Os valores encontrados para proteínas plasmáticas totais e albumina encontram-se nas faixas  $6,00 - 6,30\text{g.dL}^{-1}$  e  $3,21 - 3,34\text{g.dL}^{-1}$ , respectivamente, sugerindo semelhança com a dieta controle. Porém o teor de albumina para os grupos C, S1 e S2 situam-se levemente abaixo do mínimo estabelecido como normal ( $3,4\text{g.dL}^{-1}$ ). Estes resultados se aproximam daqueles obtidos por Santos et al. (2004); Anthony et al. (2006) e Campello et al. (2009), os quais utilizaram ratos machos com pesos e idades semelhantes aos do presente experimento.

Têm sido correlacionadas alterações nas atividades teciduais e sanguíneas com a qualidade da proteína ingerida e a integridade morfológica e funcional de alguns órgãos (MELO et al., 2008). Os níveis séricos das atividades da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransaminase (ALT) não revelaram valores estatisticamente diferentes aos do grupo controle, levando a crer não ter havido lesão no tecido hepático dos animais. No entanto, todos os grupos, inclusive o controle, apresentaram valores de AST superiores aos valores de referência de outros estudos em condições semelhantes a este (CABALLERO-CÓRDOBA, 1996; VILELA, SGARBIERI & ALVIM, 2000; ANTHONY et al., 2006; MELO et al., 2008).

Com relação à ALT os resultados encontrados são muito semelhantes aos dos autores citados anteriormente. Segundo Devlin (2007), a ALT ocorre nos hepatócitos em concentrações mais elevadas que a AST, portanto, a determinação de sua atividade no soro sanguíneo é um diagnóstico de lesão hepática mais eficaz. Ainda, conforme citado por Caballero-Córdoba & Sgarbieri (2000), a relação AST/ALT pode dar uma idéia do grau de lesão do hepatócito. Uma relação inferior a 1,0 sugere lesão citoplasmática do hepatócito (hepatite infecciosa aguda, mononucleose infecciosa, obstruções extra-hepáticas), já quando a relação é superior a 1,0 revela lesões citoplasmáticas mitocondriais do hepatócito (cirrose, esteatose, injúrias produzidas por drogas, hepatite crônica). Essas informações sugerem a presença de

lesões citoplasmáticas e/ou mitocondrial do hepatócito, visto que a relação AST/ALT variou entre 5,60 - 7,45.

A fim de confirmar ou não esses danos hepatocelulares, determinou-se a relação peso fígado (g)/peso corpóreo (g), obtendo-se valores na faixa de  $0,033 \pm 0,003$  –  $0,034 \pm 0,003$  (Tabela 3), os quais não apresentaram diferença significativa e estão em acordo com outros estudos (CABALERRO-CÓRDOBA, 1996; SHONS et al., 2009; SILVA, 2009). O fato de um único parâmetro estudado indicar lesões hepáticas pode ser explicado pela alta concentração da AST nas hemácias, onde a ocorrência de hemólise prejudica o teste fornecendo resultados falsamente elevados (MILLER, 1993).

Uma série de investigações tem demonstrado que componentes da microalga *Spirulina* como ficocianina (RICHMOND, 1990; HENRIKSON, 1995), vitamina A, ferro absorvível, compostos fenólicos, ácidos graxos essenciais (BELAY; MIYKAWA & SHIMAMATSU, 1993; VON DER WEID; DILLON & FALQUET, 2000; COLLA; MUCCILLO-BAISCH & COSTA, 2008), exercem ações fisiológicas muito importantes no organismo. Substâncias como nucleotídeos e oligossacarídeos podem atuar como moduladores do sistema imunológico, aumentando a resistência dos organismos às infecções por bactérias e vírus (VILELA, SGARBIERI & ALVIM, 2000). Um grande número de peptídeos provenientes das proteínas dos alimentos evidencia apresentar propriedades funcionais como imunoestimuladora (MILLS; ALCOCER & MORGAN, 1992).

Os elementos figurados incolores do sangue dos mamíferos são conhecidos como leucócitos e desempenham papel essencial no mecanismo de defesa do organismo contra ações infecciosas (MILLER, 1993). Conforme visto na Tabela 5, a maioria dos parâmetros analisados para determinação do leucograma não se diferenciou estatisticamente do grupo controle, exceto os valores obtidos para eosinófilos. Os resultados encontrados para leucócitos totais podem ser considerados normais quando comparados com a faixa preconizada por Sanchis & Silbiger (1986 apud Souza-Soares, Machado & Rodrigues, 2009), ou seja, 6000 a 17000/mm<sup>3</sup> e ainda quando comparado ao estudo de Santos; Madruga & Bion (2004), os quais encontraram 6350 leucócitos/mm<sup>3</sup>. Dentre os leucócitos totais os linfócitos estão presentes em níveis mais elevados, representando cerca de 50 a 95% (ANTHONY et al, 2006). Desse modo os valores obtidos se enquadram com o recomendado, visto que os grupos C, S1, S2 apresentam 72,65; 83,0; 65,5 e 75,35%, respectivamente.

Uma elevação dos níveis de neutrófilos indica infecções causadas por bactérias, o que não ocorreu no presente estudo, uma vez analisados os dados obtidos para neutrófilos bastonetes e segmentados já que todos os tratamentos apresentaram resultados estatisticamente iguais e considerados normais conforme citado por Santos; Madruga & Bion (2004). Bastonetes e segmentados constituem juntos 10 a 42% do leucograma, sendo que os n segmentados representam praticamente todo o somatório. Portanto, os valores semelhantes estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ), atingidos nesse trabalho, estão de acordo com a literatura.

Os resultados encontrados neste trabalho para níveis de monócitos não apresentaram diferença significativa entre os grupos, como também estão de acordo com outros estudos. De acordo com Sanchis & Silbiger (1986 apud Souza-Soares, Machado & Rodrigues, 2009), os monócitos representam 0 a 3% dos leucócitos totais. Santos; Madruga & Bion (2004) e Duarte et al. (2009), que avaliaram níveis da série branca em ratos *Wistar* jovens e machos, encontraram valores na faixa de 1,2 a 2,7%.

Basófilos desempenham importante papel nas respostas imunitárias corporais, pois ao menor contato com uma substância alergênica liberam mediadores químicos, como a histamina, a qual atrai as demais células de defesa (MILLER, 1993). No presente estudo encontrou-se 0% de basófilos para todos os tratamentos, como citado na literatura. Sanchis & Silbiger (1986 apud Souza-Soares, Machado & Rodrigues, 2009) e Anthony et al. (2006) preconizam como valores normais a faixa entre 0 e 1% de basófilos. Segundo Feldman; Zinkl & Jain (2000), a função primordial dos eosinófilos é combater substâncias tóxicas e portanto estarão presentes em maior quantidade nos locais onde ocorrem reações antígeno - anticorpo e nos pontos de penetração de substâncias estranhas ao organismo.

Quanto aos valores de eosinófilos, o grupo C diferiu dos demais, apresentando eosinofilia ( $p \leq 0,05$ ). De acordo com Sanchis & Silbiger (1986 apud Souza-Soares, Machado & Rodrigues, 2009) e Anthony et al. (2006), eosinófilos devem estar presentes em torno de 0 a 3%, portanto os resultados obtidos para os tratamentos com *Spirulina* estão dentro da faixa considerada normal. A eosinofilia encontrada no tratamento C pode ser indicativa de alergia alimentar, possivelmente atribuída à caseína. Bernard; Negroni & Chatel (2000); Rozenfeld et al. (2002); Silva (2007) apontaram a caseína, entre outras proteínas do leite de vaca, com um dos agentes mais freqüentemente envolvidos nas reações alergênicas.

O valor do hematócrito reflete a massa total de células na unidade de volume de sangue, mostrando fundamental importância no estudo de todos os tipos de anemia, além disso, seus resultados estão menos sujeitos a erros do que a contagem de hemácias (MILLER, 1993). Neste trabalho o tratamento com maior quantidade de *Spirulina* (S3) adicionada à dieta apresentou níveis de hematócrito mais elevados do que a dieta controle (C), mostrando sua eficiência, no entanto não diferiu dos demais tratamentos com a microalga.

Valores de hematócritos para roedores variam entre 36 e 48% (HARKNESS & WAGNER, 1993), comprovando assim níveis fisiológicos de hematócrito em todos os grupos e concordando com outros estudos (BOAVENTURA et al., 2003; DUARTE et al., 2009). A média de hemoglobina do grupo que ingeriu a dieta com maior nível de *Spirulina* (S3) foi significativamente maior que a do grupo controle (C), no entanto não diferiu das demais dietas adicionadas de *Spirulina*, concordando com os resultados do hematócrito. Os níveis de hemoglobina em todos os tratamentos podem ser considerados normais quando comparados com outros estudos. Harkness & Wagner (1993) relatam que valores médios de hemoglobina para roedores oscilam de 11 a 18%. Kappor & Mehta (1993) testaram o uso de *Spirulina* numa concentração semelhante ao tratamento S3 (24%) em associação com produtos vegetais e encontraram teores de hemoglobina aumentados.

Volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCH) indicam o tamanho das hemácias e a concentração de hemoglobina dentro das hemácias, respectivamente. Os valores encontrados para VCM não diferiram entre si como também estão dentro da faixa de 58,2 e 59,3% encontrada em ratos alimentados com dietas adicionadas de *Spirulina platensis* por Marco (2008). Em relação aos níveis de HCM, apenas a dieta S1 e S2 foram estatisticamente diferentes, no entanto todos os tratamentos adicionados de *Spirulina* foram semelhantes ao controle. Santos; Madruga & Bion (2004); Duarte et al. (2009) e Marco (2008) encontraram valores inferiores aos do presente estudo.

Eritrócitos ou hemácias são os elementos figurados mais presentes no sangue e sua baixa contagem indica deficiência em ferro e estado anêmico. Para os grupos C, S1, S2 e S3 foram encontrados valores que estão compreendidos na faixa sugerida por Sanchis & Silbiger (1986), citado por Souza-Soares, Machado & Rodrigues (2009), de 7 a 10 milhões/mm<sup>3</sup>. Marco (2008) adicionou somente 2% de *Spirulina platensis* às dietas ofertadas a ratas *Wistar*, concluindo que há viabilidade

de utilização de multimisturas adicionadas da microalga frente à prevenção de anemia ferropriva.

Tabela 5. Respostas dos índices hematológicos do sangue de ratos *Wistar* alimentados por 40 dias com dieta C (controle), S1 (8,8% de *Spirulina*), S2 (17,6% de *Spirulina*), S3 (26,4% de *Spirulina*)

Determinação	Tratamentos*			
	C	S1	S2	S3
Leucócitos t (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	6,60±1,30 <sup>a</sup>	6,75±2,75 <sup>a</sup>	5,60±2,90 <sup>a</sup>	5,65±1,90 <sup>a</sup>
Linfócitos (%)	72,65±5,80 <sup>a</sup>	83,00±6,45 <sup>a</sup>	65,50±32,35 <sup>a</sup>	75,35±6,05 <sup>a</sup>
n bastonetes (%)	0	0	0	0
n segmentado (%)	21,35±7,10 <sup>a</sup>	15,15±5,55 <sup>a</sup>	14,65±8,40 <sup>a</sup>	20,50±6,15 <sup>a</sup>
Monócitos (%)	2,15±1,50 <sup>a</sup>	1,35±1,20 <sup>a</sup>	2,50±2,35 <sup>a</sup>	3,85±1,15 <sup>a</sup>
Basófilos (%)	0	0	0	0
Eosinófilos (%)	3,85±0,75 <sup>a</sup>	0,50±0,85 <sup>b</sup>	0,65±0,80 <sup>b</sup>	0,35±0,50 <sup>b</sup>
Hematócrito (%)	43,80±1,45 <sup>a</sup>	45,00±1,15 <sup>ab</sup>	45,95±1,15 <sup>ab</sup>	46,75±2,10 <sup>b</sup>
Hemoglobina (%)	14,10±0,40 <sup>a</sup>	14,65±0,40 <sup>ab</sup>	14,60±0,20 <sup>ab</sup>	14,90±0,55 <sup>b</sup>
VCM (%)	57,70±2,30 <sup>a</sup>	59,00±0,95 <sup>a</sup>	58,25±2,10 <sup>a</sup>	57,50±1,45 <sup>a</sup>
HCM (%)	32,20±0,45 <sup>ab</sup>	32,50±0,40 <sup>b</sup>	31,60±0,30 <sup>a</sup>	31,90±0,45 <sup>ab</sup>
Eritrócitos (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	7,60±0,45 <sup>a</sup>	7,60±0,20 <sup>a</sup>	7,90±0,15 <sup>ab</sup>	8,10±0,20 <sup>b</sup>
Plaquetas (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	1063,65±269,45 <sup>a</sup>	1040,35±89,85 <sup>a</sup>	1143,00±79,80 <sup>a</sup>	985,65±155,25 <sup>a</sup>

Média de 6 repetições ±desvio padrão;

Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as dietas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Em relação às plaquetas, componentes responsáveis pela coagulação do sangue, pode-se dizer que os valores encontrados (1143 – 985mil/mm<sup>3</sup>) são superiores aos da literatura. Sanchis & Silbiger (1986), citado por Souza-Soares, Machado & Rodrigues (2009), preconizam valores entre 702 e 796mil/mm<sup>3</sup> e Duarte et

al. (2009) uma faixa de 720 a 746mil/mm<sup>3</sup> para ratos saudáveis. Essa elevação não necessariamente indica algum problema no sangue dos animais, pois de acordo com Van der Meer; Mackenzie & Dinnissen (2003) e Comar; Danchura & Silva (2009), apesar da contagem de plaquetas automatizada (CAP) ser mais precisa e exata que a contagem de plaquetas por microscopia (COM), há um risco potencial para contagens falsamente baixas ou altas. Fragmentos eritrocitários, fragmentos citoplasmáticos de células leucêmicas, micrócitos com volume próximo ao limite de corte, lipemia, bactérias e leveduras podem conduzir a resultados falsamente aumentados.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo demonstram que as dietas com 8,8, 17,6 e 26,4% de *Spirulina* cepa LEB-18 resultaram no adequado desenvolvimento de ratos *Wistar/UFPEL*, sem a ocorrência de reações adversas nas respostas bioquímicas, hematológicas, nutricionais e fisiológicas. A dieta com 8,8% de *Spirulina* foi a mais eficiente, apresentando respostas equivalentes ao controle e superiores aos demais.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo projeto de indução PRÓ-ENGENHARIA da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## REFERÊNCIAS

- ALVES, W. M. **Estudo hematológico e bioquímico do sangue de rato sob ação do cádmio em função do sexo**. França, 2006. 128p. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) – Universidade da França.
- ANTHONY, J. C. M.; MERRIMAN, T. N.; HEIMBACH, J. T. 90-Day oral (gavage) study in rats with galactooligosaccharides syrup. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 819-826, 2006.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis. **Official Methods of Analysis**, 17<sup>a</sup> Edição, Washington, D. C., CD-ROM, 2000.

- ARAÚJO, K. G. de L.; FACCHINETTI, A. D.; SANTOS, C. P. dos. Influência da ingestão de biomassas de *Spirulina* (*Arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n. 1, p. 6-9, 2003.
- BECKER, E. W. Microalgae for human and animal consumption. In *Microalgal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 222-255p.
- BECKER, E. W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 2004. 312-351p.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**. v. 25, p. 207-210, 2007.
- BELAY, A. O. Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **J Appl Phycol**, v. 5, p. 235-241, 1993.
- BERNARD, H.; NEGRONI, L.; CHATEL, J. M. Molecular basis of IgE cross-reactivity between human  $\beta$ -casein and bovine  $\beta$ -casein, a major allergen of milk. **Molecular Immunology**. v. 37, p. 161-167, 2000.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
- BOAVENTURA, G. T.; SILVA, R. H. L.; TOSTES, L. F.; AZEREDO, V. B. Ganho de peso, hemoglobina e hematócrito de ratos recebendo dieta de Quissimã, RJ, com ou sem suplemento alimentar alternativo. *Revista de Nutrição*, v. 16, n. 3, p. 321-331, 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - Lista dos Novos Ingredientes aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, maio de 2009.
- CABALLERO-CÓRDOBA, G. B. **Levedura de cervejaria: composição, valor protéico e avaliação de toxicidade subcrônica em células íntegras, células mecanicamente rompidas e concentrado protéico**. Campinas, 1997. 164p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Campinas.
- CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; SGARBIERI, V. C. Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and yeast protein

- concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 80, n. 3, p. 341-351, 2000.
- CAMPELLO, C. C.; CARVALHO, V. L.; VIEIRA, K. M.; FARIAS, D. F.; BRASIL, I. C. F.; MAIA, A. A. B.; MORAIS, J. K. S.; CARVALHO, A. F. U.; VASCONCELOS, I. M. Desempenho e parâmetros séricos de ratos alimentados com dietas contendo soja integral crua. **Braz J Vet Anim Sci**, v. 46, n. 3, p. 188-198, 2009.
- CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C.; VICENTE, E. Influence of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell wall fractions on some nutritional parameters of growing rats. **Rev. Nutr.**, v. 21, n. 2, p. 137–147, 2008.
- COLLA, L. M.; MUCCILLO-BAISCH A. L.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. **Braz Arch Biol Technol**. v. 51, n. 2, p. 405-411, 2008.
- COMAR, S. R.; DANCHURA, H. S. M.; SILVA, P. H. Platelet count: evaluation of manual methodologies and application in the laboratory routine. **Rev Bras de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 6, 2009.
- DENARDIN, C. C.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; SILVA, L. P. Influência do consumo de arroz ou de macarrão no desempenho e resposta metabólica em ratos. **Alimentos e Nutrição**. v. 20, n. 3, p. 441-449, 2009.
- DEVLIN, T. M. Textbook of biochemistry – with clinical correlations. São Paulo: Edgard Blucher, 2007. 1186p.
- DUARTE, S. M. da S.; ABREU, C. M. P. de; MENEZES, H. C.; PAULA, F. B. de A.; PEREIRA, R. G. F. A.; GOUVEA, C. M. C. P. Peeled coffee brew effect in the antioxidant activity hematological and biochemical parameters in rats. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v. 29, n. 4, p. 703-708, 2009.
- FDA - Food and Drug Administration (2003). Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>. Acesso: outubro de 2010.
- FELDMAN, B. F.; ZINKL, I. G.; JAIN, N. C. **Schalm's – Veterinary Hematology**. 5ª Edição. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.
- GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Interamericana Ltda, 1984. 926p.
- HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biology and clinical of rabbits and rodents**. 3ª Edição. São Paulo, Roca, 1993. 238p.



- HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina*: superalimento del future**. 2ª Edição. Barcelona: Editora Urano S.A, 1994. 222p.
- JOOD, S.; SINGH, M. Amino acid composition and biological evaluation of the protein quality of high lysine barley genotypes. *Plant Food for Human Nutrition*, 2001.
- KAPPOR, S. J.; MEHTA, U. Iron Status and growth of rats fed different dietary iron sources. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 44, n. 1, p.29-34, 1993.
- KUHAD, R. C.; SINGH, A.; TRIPATHI, K. K.; SAXENA, R. K. Microorganisms as an alternative source of protein. **Nutrition Reviews**. V. 55, p. 65–75, 1997.
- LEMOES, M. R. B. **Estudo comparativo de três farelos de arroz. Respostas biológicas e nutricionais, testadas em ratos *Wistar***. Rio Grande, 1999. 112p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.
- MARCO, P. L. **Avaliação da biodisponibilidade de nutrientes em multimisturas acrescidas de *Spirulina platensis***. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande do Sul.
- MELO, D. S. de; CORRÊA, A. D.; MARCOS, F. C. A.; SOUSA, R. V.; ABREU, C. M. P. de; SANTOS, C. D. Effects of cassava leaves flour on the AST, ALT, ALP enzymes activity and hepatic lipids of *Wistar* rats. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, p. 32-37, 2008.
- MILLER, D. S.; BENDER, A. E. The determination of the net protein utilization of proteins by a hortened method. **British Journal of Nutrition**, v. 9, 382–388, 1955.
- MILLER O. **Laboratório para o clínico**. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 1993. 493p.
- MILLS, E. N. C.; ALCOCER, M. J. C.; MORGAN, M.R.A. Biochemical interaction of food derived peptides. **Trends in Food Science and Technology**. v. 3, n. 3, p. 64-68, 1992.
- MITCHELL, G. V.; GRUNDEL, E.; JENKINS, M.; BLAKELY, S. R. Effects of graded dietary levels of *Spirulina maxima* on vitamins A and E in male rats. **J Nutr.**, v. 120, p. 1235-1240, 1990.
- MITRUKA, M. B.; RAWNSLEY, H. M. **Clinical, biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans**. 2ª Edição. New York: Masson Publishing, 1981. 314p.

- MOLINA, G. E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN-FERNANDEZ, F. G. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. **Biotechnology Advances** v. 20, p. 491–515, 2002.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Z. Naturforsch.** v. 63, p.144–150, 2008.
- MORTON, D. B.; ABBOT, D.; BARCLAY, R.; CLOSE, B. S.; EWBANK, R.; GASK, D.; HEATH, M.; MATTIC, S.; POOLE, T.; SEAMER, J.; SOUTHEE, J.; THOMPSON, A.; TRUSSEL, B.; WEST, C.; JENNINGS, M. Removal of blood from laboratory mammals and birds. **Laboratory Animals**, v. 27, p. 1-22, 1993.
- ORI, M.; SEGURO, C. A.; ROCHA, A. S. Efeito inibidor do soro de ratos com insuficiência renal aguda e crônica sobre a atividade fagocitária “in vitro”. **Revista Inst. Med.** v. 32, p. 409-413, 1990.
- PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **J. Food Eng.** v. 56, p. 371–375, 2003.
- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO e NO<sub>2</sub>. **Revista Química Nova.** Vol. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76 Rodent Diet. **Rodent Diet**, v. 123, n. 6, p.1939-1951, 1993.
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture.** CRC Press, Boston, 1990.
- RODRIGUES, E.R; MORETI, D. L. C.; MARTINS, C. H. G.; KASAI, A.; STOPPA, M. A.; ALVES, E. G.; PAZ, K.; LOPES, R. A.; SALA, M. A.; PETENUSCI, S. O. Estudos dos parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.**v. 8, n. 4, p. 169-172, 2006.
- ROGATTO, G. P.; OLIVEIRA, C. A. M. de; SANTOS, J. W. dos; MACHADO, F. de B.; NAKAMURA, F. Y.; MORAES, C. de; ZAGATTO, A. de M.; FARIA, M. C.; AFONSO, M.; MELLO, M. A. R. de. Influência da ingestão de *Spirulina* sobre o metabolismo de ratos exercitados. **Rev. Bras. Med. Esportiva**, v. 10, n. 4, 2004.

- ROZENFELD, P.; DOCENA, G. H.; AÑON, M. C.; FOSSATI, C. A. Detection and identification of a soy protein component that cross-reacts with caseins from cow's milk. **Clin. Exp. Immunol.** v. 130, p. 49-58, 2002.
- SANCHIS, F. S.; SILBIGER, H. L. N. **Animais de Laboratório – PURINA**. São Paulo: Purina Alimentos Ltda., 1986. 21p.
- SANTOS, H. B., MADRUGA, M. S., BION, F. M. Studies in rat: biochemical and hematological on bioavailability of minerals in diet enriched with "multimixture". **Science and Technology of Food**. v. 24, n. 4, p. 613-618, 2004.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificação**. São Paulo, Ed. Varela, 1996. 517p.
- SILVA, M. H. L. **Desenvolvimento e caracterização de um isolado protéico de soja modificado com perfil de solubilidade da caseína do leite humano**. Viçosa, 2001. 128p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- SILVA, P. V. **Leite caprino: caracterização físico-química, perfil de ácidos graxos e avaliação biológica (ratos fêmeas Wistar)**. Pelotas, 2009. 156p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.
- SHONS, P. F.; LEITE, A. V.; NOVELLO, D.; BERNARDI, D. M.; MORATO, P. N.; ROCHA, L. M.; REIS, S. M. P. M.; MIYASAKA, C. K. Protein efficiency of lentil (Lens culinares) in development of *Wistar* rat. **Food and Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 255-260, 2009.
- SOUZA-SOARES, L. A.; MACHADO, M. R. G.; RODRIGUES, R. da S. **Experimentação com animais de laboratório: manual básico**. Pelotas, Ed. Universitária – UFPel, 2009. 468p.
- STATISTICA, Statsoft. (*data analysis software system*), version 7 for Windows. www.statsoft.com.2004.
- VAN DER MEER, W.; MACKENZIE, M. A.; DINNISSEN, J. W. Pseudoplatelets: a retrospective study of their incidence and interference with platelet counting. **J Clin Pathol.**, v. 56, n. 10, p.772-774, 2003.
- VIEIRA, R. L. ; BION, F. M. Valor biológico de dieta à base de soja (*Glycine hispida*) e algaroba (*Prosopis juliflora*). **B. Ceppa**. v. 16, n. 1, p. 85-98, 1998.

- VILELA, E. S. D. ; SGARBIERI, V. C. ; ALVIM, I. D. Nutritive value of biomass of integral cells, autolysate and extract and yeast cells from beer. **Rev. Nutr.**, v. 16, p. 127-134, 2000.
- VON DER WEID, D.; DILLON, J. C.; FALQUET, J. **Malnutrition: a silent massacre**, 1ª Edição. Geneve: Antenna Technology, 2000.
- ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; SOUZA-SOARES, L. A.; QUEIROZ, M. I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresource Technology**. (publicação à frente da versão impressa), 2010.

## ARTIGO 2 - INFLUÊNCIA DE DIETAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE *Spirulina* NO DESENVOLVIMENTO CORPORAL E PERFIS LIPÍDICO E GLICÍDICO DE RATOS *WISTAR*

*Spirulina* é uma cianobactéria que vem sendo produzida e estudada devido às suas propriedades nutricionais e benéficas à saúde. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência de dietas acrescidas de diferentes concentrações de *Spirulina* LEB-18 no desenvolvimento corporal e nos perfis lipídico e glicídico de ratos *Wistar*. No presente estudo foram preparadas quatro dietas isoprotéicas (12% proteína): 1) Dieta controle (AIN93G); 2) Dieta S1, 8,8%(w/w) de *Spirulina*; 3) Dieta S2, 17,6%(w/w) de *Spirulina*; 4) Dieta S3, 26,4%(w/w) de *Spirulina*. Durante 40 dias as dietas foram distribuídas, de acordo com o respectivo tratamento, a 24 ratos *Wistar* (n=6) e avaliada através de respostas nutricionais, obtidas pelo desenvolvimento dos animais, como também por meio do estudo bioquímico do sangue e soro. O tratamento com 8,8% de *Spirulina* se mostrou equivalente ao controle, apresentando respostas mais adequadas de coeficiente de eficiência alimentar, medidas de crescimento e lipídios séricos. Já o S2 não foi capaz de promover um desenvolvimento corporal semelhante ao controle, além de elevar os níveis de colesterol total e LDL-c, enquanto que S3 apresentou somente valores inferiores de HDL-c, quando comparado ao controle e mostrou-se semelhante aos demais tratamentos adicionados de *Spirulina*.

Palavras-chave: efeito metabólico; ensaio biológico; lipídios séricos; *Rattus norvegicus*; *Spirulina*.

### INTRODUÇÃO

As microalgas são fontes economicamente viáveis de proteína para uso na alimentação. Destaque à cianobactéria *Spirulina* (*Arthrospira*), que contém cerca de 60 a 70% das proteínas, ácidos nucleicos e aminoácidos recomendados pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) (PELIZER; DANESI & RANGEL, 2003). Contém ainda beta-caroteno e ferro absorvível, além de outros minerais e altos níveis de vitaminas, compostos fenólicos, ácido gama-linolênico e outros ácidos graxos essenciais (BELAY; MIYAKAWA & SHIMAMATSU, 1993). Tem sido bastante estudada devido à presença de compostos, como a ficocianina e compostos fenólicos, que lhe conferem atividade antioxidante frequentemente associada à capacidade de prevenção e redução dos

danos causados por hiperlipidemias (MIRANDA et al., 1998, ESTRADA; BESCÓS & VILLAR DEL FRESNO, 2001, BHAT & MADYASTHA, 2001; REDDY et al., 2003; NAGAOKA et al., 2005).

Atualmente no Brasil a *Spirulina* é classificada como novo ingrediente e seu consumo diário não deve ultrapassar 1,6g/indivíduo (BRASIL, 2009). Segundo Becker (2007), entre os fatores que limitam o uso de microalgas na alimentação humana está a presença da parede celular, a qual pode influenciar na digestibilidade e absorção, e ainda o alto conteúdo de ácidos nucléicos, cuja ingestão em excesso pode levar ao seu acúmulo no organismo humano com conseqüências eventualmente negativas.

A partir do limite estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2009) estabeleceu-se o objetivo desta pesquisa, que é avaliar a influência de dietas acrescidas de diferentes concentrações de *Spirulina* LEB-18 no desenvolvimento corporal e nos perfis lipídico e glicídico de ratos *Wistar*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Biomassa microalgal

Foi utilizada a microalga *Spirulina* cepa LEB-18, produzida pela Universidade Federal do Rio Grande, Brasil (MORAIS et al., 2008).

### Modelos biológicos

24 *Rattus norvegicus Wistar/UFPel*, machos, recém desmamados (21 dias), com peso médio de 70g, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Pelotas, Brasil (UFPel) foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos (n=6), sendo alojados em gaiolas de arame galvanizado.

### Dietas

Foram preparadas quatro dietas seguindo as determinações da AIN-93G (Reeves et al., 1993), com teor protéico ajustado para 10%, sendo as fontes protéicas: 1) Dieta controle (C): caseína comercial; 2) Dieta S1: 8,8%(w/w) de *Spirulina*; 3) Dieta S2: 17,6%(w/w) de *Spirulina*; 4) Dieta S3: 26,4%(w/w) de *Spirulina* (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das dietas Controle (C), S1 (8,8% de *Spirulina*), S2 (17,6% de *Spirulina*) e S3 (26,4% de *Spirulina*)

Ingredientes (g.kg <sup>-1</sup> )	Dietas/Tratamentos			
	C	S1 <sup>1</sup>	S2 <sup>1</sup>	S3
<i>Spirulina</i> LEB-18 (56% proteína; 7,4% lipídios; 10,7% cinzas; 9,5% fibra)	-	88,0	176,0	264,0
Caseína (>85% de proteína)	120,0	50,5	1,5	-
Óleo de soja	70,0	63,5*	57,0*	50,5*
Mistura de minerais <sup>2</sup>	35,0	25,5*	16,0*	6,5*
Mistura de vitaminas <sup>2</sup>	10,0	10,0	10,0	10,0
L- cistina	3,0	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Farelo de trigo	50,0	43,5*	37,0*	30,5*
Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0
Amido de milho <sup>3</sup>	609,5	613,5	597,0	533,0

<sup>1</sup>Para obtenção de 10% de proteína, valor mínimo necessário ao desenvolvimento de roedores, as dietas experimentais S1 e S2 foram suplementadas com caseína;

<sup>2</sup>Preparado conforme AIN-93G (Reeves et al., 1993);

<sup>3</sup>Adicionado para completar a dieta; \*Descontada a quantidade intrínseca da microalga.

A formulação da dieta controle (C), apesar da recomendação de ingestão de 20% de proteínas para roedores em crescimento, foi calculada a fim de apresentar 10% deste nutriente (MILLER & BENDER, 1995; SGARBIERI, 1996; JOOD & SINGH, 2001). É importante salientar que para obtenção da dieta C com 10% de proteína foram adicionados: 120g de caseína já que essa não se apresentava pura (>85% de proteína), o restante dos ingredientes conforme preconizado por Reeves et al. (1996) e o amido de milho adicionado para completar 1000g de dieta. Para formulação das dietas S1, S2 e S3 o cálculo foi baseado na composição proximal da biomassa (Tab.1), na quantidade de ingestão diária por roedores (20g/rato/dia) (SOUZA-SOARES; MACHADO & RODRIGUES, 2009) e no limite estabelecido pela ANVISA como consumo máximo diário de *Spirulina* (1,6g/indivíduo/dia) (BRASIL, 2009).

### Métodos analíticos

A composição proximal da biomassa e das dietas foi determinada conforme métodos descritos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2000), com exceção de lipídios totais, os quais foram determinados por método de Bligh & Dyer (1959). As fezes dos animais foram avaliadas quanto ao teor de nitrogênio total (AOAC, 2000).

### Experimento *in vivo*

O experimento foi realizado durante 45 dias, sendo os 5 primeiros para adaptação dos animais ao ambiente. O laboratório permaneceu sob condições de luz (fotoperíodo de 12h) e temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) controladas, como também sob renovação de ar por sistema de exaustão. As dietas foram ofertadas diariamente (20g/rato), assim como a sua pesagem remanescente para determinação da ingesta diária. O peso corporal dos animais foi registrado a cada 7 dias para avaliação do ganho de peso. A execução do experimento seguiu as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA e foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Pelotas – RS, Brasil (processo nº 23110.008077/2009-22).

### Parâmetros ponderais dos animais

No decorrer do experimento foi realizada pesagem diária da dieta remanescente no comedouro para determinação do consumo alimentar. Da mesma forma o peso corporal dos ratos foi registrado semanalmente para cálculo do ganho de peso dos mesmos. Ao final do experimento os animais foram avaliados biometricamente através do peso corporal final, comprimento vértice-cóccix, comprimento dos membros torácicos, medida da circunferência abdominal, peso da gordura corporal (mesentérica, renal e inguinal) e do fígado (ÁGUILA; APFEL & MANDARIM-E-LACERDA, 1997).

### Avaliação nutricional

Foram realizadas as seguintes determinações para avaliação da qualidade das dietas em estudo: Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), dado pela razão entre o ganho de peso e a quantidade total de dieta ingerida durante o experimento; Quociente de Eficiência Protéica (PER), calculado através da razão entre ganho de peso e a quantidade total de proteína consumida e Digestibilidade



Lipídica Aparente ( $DA_{lipídica}$ ), obtida através do cálculo:  $[\text{lipídio ingerido} - \text{lipídio excretado nas fezes/lipídio ingerido}]100$  (SGARBIERI, 1996).

#### Análise bioquímica do sangue e soro

Ao término do experimento, após os animais serem submetidos a um jejum de 12h, foi realizada sedação em câmpula com éter etílico, sendo imediatamente feita coleta de sangue por punção cardíaca. Imediatamente à sedação, alíquotas de sangue foram destinadas à determinação de glicemia direta em glicosímetro ACCUTREND GCT (Laboratórios Roche do Brasil®) e o restante centrifugado a 1000g x 15 min a 4°C, em tubos de ensaio, para obtenção do soro que foi congelado a -18°C (LEMOS, 1999) para posterior análise em avaliador bioquímico LabMax 240 (LABTEST DIAGNÓSTICA S.A.).

#### Análise estatística

Foram realizadas Análises de Variância (ANOVA), seguidas do teste de Tukey para comparação entre as médias num nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o *software* Statistica 7.0 (Statsoft, EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao se compararem as respostas dos parâmetros ponderais e nutricionais dos tratamentos com *Spirulina* (S1, S2 e S3) com as do controle (C) (Tab. 2) pode-se verificar que: S3 não apresentou diferença em relação aos parâmetros analisados; S2 apresentou valores inferiores de peso final, ganho de peso, consumo alimentar total e medidas de vértice-cóccix, circunferência abdominal e coeficiente de eficiência alimentar (CEA); o consumo alimentar do tratamento S1 foi significativamente menor ( $p \leq 0,05$ ); não houve diferença significativa quanto à digestibilidade lipídica aparente ( $DA_{lipídica}$ ).

Observa-se ainda que, entre os três tratamentos com *Spirulina*, os animais do grupo S2 apresentaram peso final, ganho de peso, vértice-cóccix, membros torácicos, e circunferência abdominal e CEA inferiores ( $p \leq 0,05$ ) aos animais do grupo S1.

Tabela 2. Respostas ponderais e nutricionais de ratos *Wistar* alimentados por 40 dias com dieta C (controle), S1 (8,8% de *Spirulina*), S2 (17,6% de *Spirulina*), S3 (26,4% de *Spirulina*)

	Tratamentos			
	C	S1	S2	S3
Peso inicial (g)*	70,65±11,15 <sup>a</sup>	70,33±7,10 <sup>a</sup>	68,33±8,80 <sup>a</sup>	73,65±7,10 <sup>a</sup>
Peso final (g)	253,33±27,35 <sup>a</sup>	263,65±20,00 <sup>a</sup>	200,35±19,25 <sup>b</sup>	232,65±14,50 <sup>ab</sup>
Ganho peso (g)	182,65±35,00 <sup>a</sup>	175,33±20,90 <sup>a</sup>	134,33±14,05 <sup>b</sup>	156,15±15,75 <sup>ab</sup>
Consumo total alimentar (g)	622,10±22,30 <sup>a</sup>	573,45±26,60 <sup>b</sup>	575,85±30,25 <sup>b</sup>	654,25±24,00 <sup>a</sup>
Consumo diário <i>Spirulina</i> (g)	0 <sup>a</sup>	50,45±2,35 <sup>b</sup>	101,33±5,30 <sup>c</sup>	172,70±6,30 <sup>d</sup>
Vértice-cóccix (cm) <sup>1</sup>	20,85±0,80 <sup>a</sup>	20,98±0,35 <sup>a</sup>	19,60±0,85 <sup>b</sup>	20,25±0,80 <sup>ab</sup>
Membros torácicos(cm) <sup>2</sup>	13,30±0,65 <sup>ab</sup>	13,35±0,40 <sup>b</sup>	12,55±0,40 <sup>a</sup>	13,15±0,40 <sup>ab</sup>
Circunferência abdominal (cm)	16,10±1,05 <sup>a</sup>	16,00±0,85 <sup>a</sup>	13,95±0,65 <sup>b</sup>	14,95±1,15 <sup>ab</sup>
Gordura total (g)/peso corpóreo(g)	0,023±0,017 <sup>a</sup>	0,023±0,016 <sup>a</sup>	0,020±0,008 <sup>a</sup>	0,020±0,013 <sup>a</sup>
CEA	0,28±0,05 <sup>ab</sup>	0,32±0,04 <sup>b</sup>	0,23±0,04 <sup>a</sup>	0,22±0,03 <sup>a</sup>
DA(lipídica)	78,25±3,55 <sup>a</sup>	75,60±3,50 <sup>a</sup>	69,45±3,55 <sup>a</sup>	75,25±3,70 <sup>a</sup>

Média de 6 repetições ±desvio padrão;

Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as dietas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ );

\*Após 5 dias de adaptação

CEA: coeficiente de eficiência alimentar;

PER: quociente de eficiência protéica;

DA(lipídica): digestibilidade lipídica aparente.

O tratamento S3 mostrou-se semelhante ao S1 e S2. Contudo, o tratamento com 8,8% (w/w) de *Spirulina* apresentou resultados mais próximos aos do grupo controle. Apesar de o consumo ter sido inferior no tratamento S1, este diferiu positivamente dos demais ( $p \leq 0,05$ ) quanto ao Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), demonstrando melhor conversão do alimento ingerido. Segundo Chaud, Sgarbieri & Vicente (2008) a redução da eficiência alimentar ocorre devido à diminuição metabólica do organismo frente à determinada dieta, causando estagnação ou redução do peso corporal. Mitchell et al. (1990), após tratarem ratos

*Wistar* machos durante 60 dias para avaliar o efeito de diferentes concentrações (0%; 2,7%; 10,7%; 18,7% e 26,7%) de *Spirulina* máxima sob os níveis de vitaminas A e E constataram que o CEA foi inversamente proporcional à ingestão da biomassa.

De acordo com Vieira & Bion (1998) proteínas originadas de diferentes misturas e usadas em diferentes proporções podem resultar em variações nas concentrações de aminoácidos limitantes, os quais interferem na eficiência de sua utilização pelo homem e animais. Rogatto et al. (2004) analisaram uma dieta com 17% de *Spirulina* em substituição total à proteína da dieta controle (caseína) em ratos machos jovens *Wistar* durante cinco semanas e obtiveram CEA de 0,21, valor este semelhante ao que se encontrou nos tratamentos com 17,6% e 26,4% de *Spirulina* (0,23 e 0,22; respectivamente).

Proteínas de menor qualidade ou combinação de diferentes proteínas que apresentam deficiências em aminoácidos essenciais serão preferencialmente destinadas a vias metabólicas de catabolismo. Após a degradação das proteínas ingeridas em seus aminoácidos no trato gastrintestinal, estes alcançam o fígado através da corrente sanguínea. Chegando ao fígado, o primeiro passo no catabolismo dos aminoácidos é a remoção dos grupos amino através da ação de transaminases, resultando na formação de glutamato e unidades de três e quatro átomos de carbonos ( $\alpha$ -cetoácidos). Estes esqueletos carbônicos provenientes da desaminação dos aminoácidos são convertidos em glicose, através da gliconeogênese, a qual poderá ser utilizada para suprir as necessidades energéticas das células ou ser armazenada na forma de ácidos graxos através do metabolismo hepático (LEHNINGER, 2006).

A hiperlipidemia caracteriza-se por uma série de distúrbios ocasionados pelo excesso de substâncias, dentre estas o colesterol, triacilgliceróis e lipoproteínas do plasma sanguíneo, como HDL (lipoproteína de alta densidade), LDL (lipoproteína de baixa densidade) e VLDL (lipoproteína de densidade muito baixa), sendo um importante fator de risco no desenvolvimento de doenças cardíacas e de arteriosclerose. Comparando-se os tratamentos com *Spirulina* (S1, S2 e S3) ao controle (C) observa-se que o S1 não diferiu significativamente; S2 causou níveis de colesterol total e LDL-c mais elevados ( $p \leq 0,05$ ); S3 resultou em HDL-c inferior ( $p \leq 0,05$ ). Os tratamentos não diferiram quanto aos triacilgliceróis e glicose sanguínea (Tab.3).

Tabela 3. Respostas dos níveis bioquímicos do sangue de ratos *Wistar* alimentados por 40 dias com dieta C (controle), S1 (8,8% de *Spirulina*), S2 (17,6% de *Spirulina*), S3 (26,4% de *Spirulina*)

Determinação	Tratamentos			
	C	S1	S2	S3
Colesterol total (mg.dL <sup>-1</sup> )	70,15±8,49 <sup>a</sup>	64,50±10,83 <sup>a</sup>	88,83±3,90 <sup>b</sup>	64,50±11,15 <sup>a</sup>
HDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	30,50±3,70 <sup>a</sup>	28,15±3,90 <sup>ab</sup>	34,16±1,72 <sup>a</sup>	23,65±2,33 <sup>b</sup>
LDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	23,15±9,05 <sup>a</sup>	20,65±12,20 <sup>a</sup>	39,15±3,15 <sup>b</sup>	27,35±4,85 <sup>ab</sup>
LDL/HDL	0,75±0,30 <sup>ab</sup>	0,70±0,35 <sup>b</sup>	1,14±0,15 <sup>a</sup>	1,15±0,20 <sup>a</sup>
VLDL (mg.dL <sup>-1</sup> )	16,60±6,65 <sup>a</sup>	15,50±6,15 <sup>a</sup>	15,56±4,27 <sup>a</sup>	13,26±5,34 <sup>a</sup>
Triacilgliceróis (mg.dL <sup>-1</sup> )	70,95±16,55 <sup>a</sup>	77,50±30,70 <sup>a</sup>	78,00±21,30 <sup>a</sup>	66,35±26,75 <sup>a</sup>
Glicose (mg.dL <sup>-1</sup> )	107,33±25,30 <sup>a</sup>	99,50±15,25 <sup>a</sup>	88,00±17,95 <sup>a</sup>	98,83±20,91 <sup>a</sup>

Média de 6 repetições ±desvio padrão;

Letras distintas em uma mesma linha indicam diferença significativa entre as dietas pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Se for tomado como referência o valor médio de colesterol total (46mg.dL<sup>-1</sup>) em *Rattus norvegicus* sadios descrito por Mitruka & Rawnsley (1981), os tratamentos S1 e S3 apresentam as melhores respostas. Vilela, Sgarbieri & Alvim (2000), ao avaliarem os níveis séricos de lipídios em ratos *Wistar*, com 21 dias, sob ação de uma dieta com extrato protéico de leveduras em substituição à caseína, constataram que esta (58mg.dL<sup>-1</sup> de colesterol total) se comportou semelhantemente ao controle com caseína (60mg.dL<sup>-1</sup> de colesterol total). Marco (2008), em seu estudo sobre a biodisponibilidade de nutrientes em multimisturas, obteve respostas de colesterol total próximas às encontradas nos grupos S1 e S3. No mesmo estudo os animais que consumiram uma multimistura com adição de farelo de arroz e *Spirulina* apresentaram 64,5mg.dL<sup>-1</sup> de colesterol total.

Denardin et al. (2009) encontraram 62,67 e 72,93mg.dL<sup>-1</sup> de colesterol total em ratos *Wistar* alimentados com dieta com arroz e macarrão em substituição à

caseína, respectivamente. Bertolin et al. (2009), autores que estudaram o efeito da *S. platensis* no perfil lipídico de ratos *Wistar*, não encontraram alteração significativa ao tratar os animais com dieta hipercolesterolêmica acrescida de *Spirulina* por 60 dias, sugerindo que a microalga associada a uma dieta rica em colesterol não altera os níveis lipídicos. Assim como para o colesterol total, os valores para LDL-c também se apresentaram elevados ( $p \leq 0,05$ ) nos animais do tratamento S2, ou seja, houve proporção entre os valores, fato esperado uma vez que essa fração representa cerca de dois terços do colesterol total (MILLER, 1993).

Bertolin et al. (2009) não avaliaram os níveis de LDL-c individualmente e sim em somatório ao valor de VLDL-c, obtendo  $60,1 \text{mg.dL}^{-1}$ . Ao somar-se os resultados obtidos de LDL-c e VLDL no presente estudo encontra-se os seguintes valores: 39,75; 36,15; 54,71 e  $40,61 \text{mg.dL}^{-1}$  para C, S1, S2 e S3, respectivamente. Estes valores, quando calculados os seus percentuais em relação ao do colesterol total, mostram índices de 56,7 % (dieta controle), 56,0 % (S1), 61,6% (S2) e 62,8 % (S3) em relação aos mesmos, permitindo uma resposta mais harmônica entre as dietas. Assemelham-se aos obtidos por Bertolin et al. (2009) para as dietas fornecidas durante 30 e 60 dias, respectivamente, que foram 61,5 e 76,7 % (controle), 34,6 e 69,5 % (hiperlipídica com 5% de colesterol) e 41,8 e 60,7 % (hiperlipídica com 5% de *Spirulina*), indicando, nas respostas, o efeito da duração do experimento, e que a presença de *Spirulina* na dieta hiperlipêmica, em função deste, não foi efetiva. Evidenciam, também, a tendência hiperlipêmica das dietas contendo caseína.

Na patogênese da aterosclerose, a lipoproteína de alta densidade (HDL-c) apresenta um importante papel protetor, pois transporta o excesso de colesterol das artérias e corrente sanguínea até o fígado onde é metabolizado e eliminado sob a forma de ácidos e sais biliares (VAZ et al., 2006; DUARTE et al., 2009). Na Tab. 3 observa-se que o tratamento com maior percentual de *Spirulina* (S3) apresentou níveis de HDL-c inferiores ( $p \leq 0,05$ ) ao controle. Bertolin et al. (2009) encontraram níveis de HDL-c igual a  $12,3 \text{mg.dL}^{-1}$  nos animais do grupo controle e  $32,3 \text{mg.dL}^{-1}$  nos animais alimentados com dieta hipercolesterolêmica acrescida de *Spirulina*.

De forma semelhante ao que foi relatado anteriormente, em relação aos valores de colesterol total, os dados para colesterol HDL deste trabalho, quando considerados seus percentuais indicam 43,5% (C), 43,6% (S1), 36,5% (S2) e 36,6% (S3) assemelhando-se aos de Bertolin, 2009, que foram, respectivamente 38,9 e 19,7% (c), 56,7 e 27,5 (hiperlipídica) e 45,6 e 32,5 % (hiperlipídica + 5% de *Spirulina*). Estes

valores , quando calculados os seus percentuais em relação aos de colesterol total, mostram índices de 56,7 % (dieta Controle), 56,0 % (S1), 61,6% (S2) e 62,8 % (S3) em relação aos mesmo. Vilela, Sgarbieri e Alvim (2000) relatam que uma dieta com extrato protéico de leveduras em substituição à caseína, comportou-se semelhantemente (45 mg.dL<sup>-1</sup>) à com caseína (50mg.dL<sup>-1</sup>) quanto ao teor de HDL-c presente no soro de ratos *Wistar*.

Embora, ainda não tenha sido determinada a relação LDL/HDL ideal para roedores e o valor estipulado para humanos não possa ser comparado diretamente, convencionou-se que esta relação deva ser a menor possível para indicar uma característica benéfica. O tratamento S1 apresentou relação LDL/HDL inferior ( $p \leq 0,05$ ) a S2 e S3. Contudo, as três dietas acrescidas de *Spirulina* comportaram-se de forma semelhante à dieta controle, como também apresentaram valores superiores aos encontrados por Silva (2009). O autor citado, ao avaliar biologicamente uma dieta à base de leite caprino, encontrou 0,43 e 0,30 mg.dL<sup>-1</sup> em ratos fêmeas *Wistar* alimentados com dietas controle e experimental, respectivamente. Triacilgliceróis são os lipídios presentes em maior quantidade na alimentação e constituem a forma de armazenamento de todo o excesso de nutrientes, seja carboidrato, proteína ou o próprio lipídio, representando a maior reserva energética dos mamíferos (VAZ et al., 2006).

Os tratamentos C, S1, S2 e S3 não diferiram quanto aos níveis de triacilgliceróis, sendo estes apresentados numa faixa de 66,35 a 78,00mg.dL<sup>-1</sup>. De acordo com dados preconizados pela equipe do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP, 2010) triacilgliceróis devem estar presentes no soro de *Rattus norvegicus* sadios em torno de 66,35 à 78,00mg.dL<sup>-1</sup>. Nos trabalhos de Marco (2008) e Bertolin (2009), citados anteriormente, foram encontrados 61,00 e 165mg.dL<sup>-1</sup>, respectivamente.

Os valores encontrados para glicose sanguínea apresentaram-se entre 88,00 e 107,33mg.dL<sup>-1</sup>, não revelando diferença significativa entre os tratamentos. Mitruka & Rawnsley (1981); Harkness & Wagner (1993) sugerem que *Rattus norvegicus* devem apresentar níveis glicêmicos entre 50 e 135mg.dL<sup>-1</sup> para serem considerados sadios, portanto todos os tratamentos obtiveram respostas de acordo com o recomendado. Rogatto et al. (2004) avaliaram a influência de uma dieta com 17% de *Spirulina* sobre o metabolismo de ratos exercitados e obtiveram 73 e 117mg.dL<sup>-1</sup> de glicose sanguínea para os animais em repouso e exercitados, respectivamente. Ratos alimentados com

multimistura (farelo de arroz + *Spirulina*) durante 42 dias apresentaram, em média, 88,7mg.dL<sup>-1</sup> de glicemia (MARCO, 2008).

A utilização da *Spirulina* como alimento tem sido bastante discutida na literatura devido ao fato de ser boa fonte de proteína, vitaminas, minerais e ácidos graxos poliinsaturados (ROGATTO et al., 2004; AMBROSI et al., 2008). Segundo Colla; Muccilo-Baisch & Costa (2008) a presença de compostos antioxidantes, como ficocianina, compostos fenólicos, e ácidos graxos poliinsaturados podem ser os principais responsáveis pela diminuição dos níveis lipídicos. A capacidade antioxidante de extratos de *Spirulina* foi avaliada por Miranda et al. (1998) no plasma de ratos *Wistar* adultos, os quais receberam uma dose diária de 5mg/dia do extrato por 2 e 7 semanas. Os autores consideraram que as quantidades de ácidos fenólicos,  $\alpha$ -tocoferol e  $\beta$ -caroteno presentes na *Spirulina* foram responsáveis pela redução dos níveis lipídicos dos animais.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao se analisar, de forma geral, as respostas obtidas nos tratamentos C, S1, S2 e S3, verifica-se que as diferentes concentrações de *Spirulina* cepa LEB-18 (8,8, 17,6 e 26,4%) agiram diferentemente sobre o desenvolvimento corporal e níveis bioquímicos determinados. O tratamento com 8,8% de *Spirulina* se mostrou equivalente ao controle, apresentando respostas mais adequadas de CEA, medidas de crescimento e lipídios séricos. Já o S2 não foi capaz de promover um bom desenvolvimento corporal comparativamente ao controle, além de elevar os níveis de colesterol total e LDL-c, enquanto que S3 apresentou somente valores inferiores de HDL-c, quando comparado ao controle ( $p \leq 0,05$ ).

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo projeto de indução PRÓ-ENGENHARIA da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## REFERÊNCIAS

- ÁGUILA, M. B.; APFEL, M. I. R.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Comparação morfológica e bioquímica entre ratos envelhecidos alimentados com dieta hiperlipídica e com óleo de canola. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 68, n. 3, p. 155-161, 1997.
- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista de Ciência Básica Aplicada**. v. 29, n. 2, p. 109-117, 2008
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis. **Official Methods of Analysis**, 17ª Edição, Washington, D. C., CD-ROM, 2000.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**. v. 25, p. 207–210, 2007.
- BELAY, A. O. Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **J Appl Phycol**, v. 5, p. 235-241, 1993.
- BERTOLIN, T. E.; PILATTI, D.; GIACOMINI, A. C. V. V.; BAVARESCO, C. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 52, n. 5, p. 1253-1259, 2009.
- BHAT, V. B.; MADAYASTHA, M. Scavenging of Peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: protection against oxidative damage to DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 285, p. 262-266, 2001.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
- BRASIL. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - Lista dos Novos Ingredientes aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em maio de 2009.
- CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C.; VICENTE, E. Influence of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell wall fractions on some nutritional parameters of growing rats. **Revista de Nutrição**., v. 21, n. 2, p. 137–147, 2008.
- COLLA, M. L.; MUCCILO-BAISCH, A. M.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* Effects on the Levels of Total Cholesterol HDL and Triacylglycerols in Rabbits Fed with a



- Hypercholesterolemic Diet. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. V.51, n. 2, p. 405-411, 2008.
- DENARDIN, C. C.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; SILVA, L. P. Influência do consumo de arroz e macarrão no desempenho e resposta metabólica em ratos. **Alimentos e Nutrição**. v. 20, n. 3, p. 441-449, 2009.
- DUARTE, S. M. da S.; ABREU, C. M. P. de; MENEZES, H. C.; PAULA, F. B. de A.; PEREIRA, R. G. F. A.; GOUVEA, C. M. C. P. Peeled coffee brew effect in the antioxidant activity hematological and biochemical parameters in rats. **Ciênc. Tecnol. Aliment**. v. 29, n. 4, p. 703-708, 2009.
- ESTRADA, J. E. P.; BESCÓS, P. B.; VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract: **II Farmaco**. v. 56, p. 497-500, 2001.
- FMUSP – Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.biot.fm.usp.br/site1/index-2.html>. Acesso: outubro de 2010.
- HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biology and clinical of rabbits and rodents**. 3ª Edição. São Paulo, Roca, 1993. 238p.
- JOOD, S.; SINGH, M. Amino acid composition and biological evaluation of the protein quality of high lysine barley genotypes. *Plant Food for Human Nutrition*, 2001.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2ª Edição. São Paulo: SARVIER, 2006. 839 p.
- LEMOS, M. R. B. **Estudo comparativo de três farelos de arroz. Respostas biológicas e nutricionais, testadas em ratos Wistar**. Rio Grande, 1999. 112p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.
- MARCO, P. L. **Avaliação da biodisponibilidade de nutrientes em multimisturas acrescidas de *Spirulina platensis***. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande do Sul.
- MILLER, D. S.; BENDER, A. E. The determination of the net protein utilization of proteins by a hortened method. **British Journal of Nutrition**, v. 9, 382–388, 1955.
- MILLER O. **Laboratório para o clínico**. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 1993. 493p.

- MITCHELL, G. V.; GRUNDEL, E.; JENKINS, M.; BLAKELY, S. R. Effects of graded dietary levels of *Spirulina maxima* on vitamins A and E in male rats. **J Nutr.**, v. **120**, p. 1235-1240, 1990.
- MITRUKA, M. B.; RAWNSLEY, H. M. **Clinical, biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans.** 2ª Edição. New York: Masson Publishing, 1981. 314p.
- MIRANDA, M. S.; CINTRA, R. G.; BARROS, S. B. M.; FILHO, J. M. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** V. 31, p. 1075-1079, 1998.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F.; COSTA, J. A .V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Z. Naturforsch.** v. 63, p.144–150, 2008.
- NAGAOKA, S.; SHIMIZU, K.; KANEKO, H.; SHIBAYAMA, F.; MORIKAWA, K.; KANAMARU, Y.; OTSUKA, A.; HIRAHASHI, T.; KATO, T. A novel protein Cphycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats: **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 2425-2430, 2005.
- PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **J. Food Eng.** v. 56, p. 371–375, 2003.
- REDDY, M. C.; SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; BHAT, V. B.; REDDY, P. S.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K.M.; REDDANNA, P. C-phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide- stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 304, p. 385-392, 2003.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76 Rodent Diet. **Rodent Diet**, v. 123, n. 6, p.1939-1951, 1993.
- ROGATTO, G. P.; OLIVEIRA, C. A. M. de; SANTOS, J. W.; MACHADO, F. de B.; NAKAMURA, F. Y.; MORAES, C. de; ZAGATTO, A. de M.; FARIA, M. C.; AFONSO, M.; MELLO, M. A. R. de. Influência da ingestão de e *Spirulina* sobre o metabolismo de ratos exercitados. **Rev. Bras. Med. Esportiva**, v. 10, n. 4, 2004.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificação.** São Paulo, Ed. Varela, 1996. 517p.

- STATISTICA, Statsoft. (*data analysis software system*), version 7 for *Windows*.  
www.statsoft.com.2004.
- SILVA, P. V. **Leite caprino: caracterização físico-química, perfil de ácidos graxos e avaliação biológica (ratos fêmeas *Wistar*)**. Pelotas, 2009. 156p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.
- SOUZA-SOARES, L. A.; MACHADO, M. R. G.; RODRIGUES, R. da S. **Experimentação com animais de laboratório: manual básico**. Pelotas, Ed. Universitária – UFPel, 2009. 468p.
- VAZ, J. S.; DEBONI, F.; AZEVEDO, J.; GROSS, J. L.; ZELMANOVITZ, T. Fatty acids as biological markers of fat intake. *Revista de Nutrição*. V. 19, n. 4, p. 489-500, 2006
- VIEIRA, R. L. ; BION, F. M. Valor biológico de dieta à base de soja (*Glycine hispida*) e algaroba (*Prosopis juliflora*). **B. Ceppa**. v. 16, n. 1, p. 85-98, 1998.
- VILELA, E. S. D. ; SGARBIERI, V. C. Determination of protein value of integral cells, total autolysate and yeast extract (*Saccharomyces sp.*). **Rev. Nutr.**, v. 13, n. 3, p. 185-192, 2000.

### ARTIGO 3 - *Spirulina* COMO FONTE PROTÉICA NA RECUPERAÇÃO NUTRICIONAL DE RATOS *Wistar*

O presente estudo objetivou avaliar os efeitos da *Spirulina* como fonte de proteína durante a recuperação nutricional de ratos submetidos à desnutrição protéica. Para inferir sobre este efeito, foram analisadas respostas referentes ao desenvolvimento corpora, perfil bioquímico do soro e hemograma dos animais em estudo. Nesta pesquisa, 23 *Rattus norvegicus Wistar/UFPel*, numa primeira fase (desnutrição), receberam uma dieta aprotéica (AIN-93G adaptada) durante 10 dias. Após este período os animais foram separados em 4 grupos de acordo com a fonte protéica (fase de recuperação): Controle (C), caseína 12%; *Spirulina* nível I (S1), 8,8% de *Spirulina* + 5,0% de caseína; *Spirulina* nível II (S2), 17,6% de *Spirulina* + 0,15% de caseína e *Spirulina* nível III (S3), 26,4% de *Spirulina*. A fase de recuperação (fase II) durou 30 dias, sendo monitorado, diariamente o consumo de dieta e semanalmente o peso corporal dos animais, em ambas as fases. O tratamento S1 apresentou maiores valores de CEA e PER ( $p \leq 0,05$ ). As diferenças significativas entre os tratamentos ocorreram, principalmente, nos níveis de lipídios séricos, sendo observado que a dieta S2 causou um maior aumento destas respostas ( $p \leq 0,05$ ). Contudo, estes resultados demonstram que as diferentes concentrações de *Spirulina* LEB-18 permitiram a recuperação nutricional dos animais.

Palavras-chave: desnutrição protéica; ratos; recuperação nutricional; *Rattus norvegicus*; *Spirulina*.

#### INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 30% da população mundial é subnutrida e 40.000 crianças morrem a cada dia devido à desnutrição e doenças relacionadas (WHO, 2007). No Brasil, segundo dados apresentados pela Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) em duas décadas, o Nordeste, região do país mais afetada pela carência nutricional, teve uma redução de mais de três vezes nos índices de desnutrição em crianças de cinco a nove anos, no entanto este problema permanece, comprometendo o desenvolvimento destas crianças (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2010).

Seja qual for a causa da desnutrição, o organismo gera respostas conforme o tempo em que é submetido à carência de nutrientes. De acordo com Rogatto et al.

(2004), a utilização de substratos energéticos diminui o gasto energético quando a ingestão de energia é reduzida. Esta automodulação entre consumo e gasto é mantida até um momento em que o gasto energético não pode mais ser compensado pela ingestão insuficiente. Dessa forma, o organismo utiliza-se de suas reservas de gordura, o que resulta em perda de tecido adiposo e peso corporal.

Os metabolismos de carboidratos e proteínas também sofrem com a carência nutricional, apresentando redução dos estoques de glicogênio e proteínas no músculo e fígado. Ao mesmo tempo, podem ser observadas maiores concentrações de lipídios hepáticos em função da deficiência do transporte de gorduras. As alterações metabólicas geradas pela insuficiência protéica podem ser as mais diversas possíveis no organismo, desde uma redução do peso corporal até uma diminuição do sistema imunológico (QUEVEDO et al., 2002).

Segundo Alves; Voltarelli & Mello (2005) há décadas a desnutrição protéica vem preocupando autoridades ligadas aos setores de saúde pública, principalmente a OMS, cujos técnicos têm debatido a descoberta e o emprego de novas fontes protéicas bem como as normas a serem seguidas para seu uso na alimentação humana. Nesse sentido micro-organismos têm sido constantemente estudados como possíveis fontes protéicas. Cianobactérias como fonte de proteína tem certas vantagens sobre a utilização frente a outros micro-organismos devido ao seu rápido crescimento e quantidade e qualidade da proteína (MOLINA; BERLARBI & ACIÉN-FERNANDEZ, 2002).

Dentre as microalgas, a do gênero *Spirulina* (*Arthrospira*) contém cerca de 60 a 70% das proteínas, ácidos nucléicos e aminoácidos recomendados pela FAO (*Food and Agriculture Organization*) (PELIZER; DANESI & RANGEL, 2003). Contém ainda beta-caroteno e ferro absorvível, além de outros minerais, e altos níveis de vitaminas, compostos fenólicos, ácido gama-linolênico e outros ácidos graxos essenciais (BELAY; MIYAKAWA & SHIMAMATSU, 1993; VON DER WEID; DILLON & FALQUET, 2000).

Atualmente, no Brasil, a *Spirulina* é classificada como novo ingrediente e seu consumo diário não deve ultrapassar 1,6g/indivíduo (BRASIL, 2009). O FDA (*Food and Drug Administration*), após classificar esta microalga como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), sugere uma média de ingestão diária igual a 3g/indivíduo (FDA, 2003). Segundo Becker (2007), entre os fatores que limitam o uso de proteína unicelular na alimentação humana está a presença da parede celular, a qual pode influenciar na digestibilidade e absorção, e ainda o alto conteúdo de ácidos nucléicos, cuja ingestão em excesso pode levar ao acúmulo no organismo humano com conseqüências eventualmente negativas.

A presente pesquisa foi delineada para avaliar os efeitos da *Spirulina* na recuperação nutricional de ratos submetidos à desnutrição protéica, sobre o crescimento e aspectos bioquímicos e hematológicos do sangue.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Biomassa microalgal

Foi utilizada a microalga *Spirulina* cepa LEB-18, produzida pela Universidade Federal do Rio Grande, Brasil (MORAIS et al., 2008).

### Modelos biológicos

Foram utilizados 23 *Rattus norvegicus* Wistar/UFPel, machos, recém desmamados (21 dias), com peso médio de 70g, gentilmente cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas, Brasil (UFPel).

### Dietas

Cinco dietas (Tab. 1), baseadas na formulação para roedores em crescimento (AIN93G) descrita por Reeves et al. (1993), foram preparadas semanalmente no Laboratório de Processamento de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da UFPel: Dieta controle (C): AIN93G adaptada para 10% de proteínas; Dieta aprotéica (A): sem adição de proteína; Dieta S1: 8,8% (w/w) de *Spirulina*; Dieta S2: 17,6% (w/w) de *Spirulina* e Dieta S3: 26,4% (w/w) de *Spirulina*. A formulação da dieta controle (C), apesar da recomendação de ingestão de 20% de proteínas para roedores em crescimento, foi calculada a fim de apresentar 10% deste nutriente (MILLER & BENDER, 1995; SGARBIERI, 1996; JOOD & SINGH, 2001). É importante salientar que para obtenção da dieta C com 10% de proteína foram adicionados: 120g de caseína já que essa não se apresentava pura (>85% de proteína), o restante dos ingredientes conforme preconizado por Reeves et al. (1996) e o amido de milho adicionado para completar 1000g de dieta. Para formulação das dietas S1, S2 e S3 o cálculo foi baseado na composição proximal da biomassa (Tab.1), na quantidade de ingestão diária por roedores (20g/rato/dia) (SOUZA-SOARES; MACHADO & RODRIGUES, 2009) e no limite estabelecido pela ANVISA como consumo máximo diário de *Spirulina* (1,6g/indivíduo/dia) (BRASIL, 2009).

### Experimento *in vivo*

O experimento foi realizado durante 45 dias, sendo os 5 primeiros para adaptação dos animais ao ambiente. Ao término do período de adaptação os animais foram pesados e deu-se início a FASE I do experimento (desnutrição). Nesta fase cada animal recebeu diariamente 20g de dieta aprotéica (A) e água *ad libitum* durante 10 dias consecutivos. Após este período os animais foram pesados e redistribuídos por sorteio em quatro grupos: C (n=6); S1 (n=5); S2 (n=6) e S3 (n=6), dando início à FASE II. Nesta fase, que compreendeu 30 dias de estudo, cada rato recebeu diariamente 20g da respectiva dieta com adição de proteína, visando à recuperação nutricional. Durante todo o ensaio *in vivo* os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas de aço inoxidável e o laboratório permaneceu sob condições de luz (fotoperíodo de 12h) e temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) controladas, como também sob renovação de ar por sistema de exaustão. Semanalmente foi realizado rodízio da posição das gaiolas, para uniformizar as condições ambientais. A execução do experimento seguiu as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Federal de Pelotas – RS, Brasil (processo nº 23110.008077/2009-22).

### Parâmetros ponderais dos animais

No decorrer do experimento (Fases I e II) foi realizada pesagem diária da dieta remanescente no comedouro para determinação do consumo alimentar. Da mesma forma o peso corporal dos animais foi registrado semanalmente para avaliação do ganho de peso dos mesmos. Ao final do experimento os animais foram avaliados biometricamente através da medida do peso corporal, comprimento vértice-cóccix, comprimento dos membros torácicos, medida da circunferência abdominal, peso da gordura corporal (mesentérica, renal e inguinal) e do fígado (ÁGUILA; APFEL & MANDARIM-DE-LACERDA, 1997).

### Análise das dietas e fezes

As dietas e fezes dos animais recuperados de todos os grupos tiveram seus teores protéicos determinados, em triplicata, através do método *Kjeldahl* (AOAC, 2000). O fator utilizado para conversão do nitrogênio foi 6,25 para todas as amostras. As fezes analisadas foram coletadas durante os sete últimos dias do experimento.

Tabela 1. Formulação das dietas C (controle), S1 (8,8% de *Spirulina*), S2 (17,6% de *Spirulina*), S3 (26,4% de *Spirulina*) e A (aproteica)

Ingredientes (g.kg <sup>-1</sup> )	Dietas/Tratamentos				
	C	S1 <sup>1</sup>	S2 <sup>1</sup>	S3	A
<i>Spirulina</i> LEB-18 (56% proteína; 7,4% lipídios; 10,7% cinzas; 9,5% fibra)	-	88,0	176,0	264,0	-
Caseína (>85% de proteína)	120,0	50,5	1,5	-	-
Óleo de soja	70,0	63,5*	57,0*	50,5*	70,0
Mistura de minerais <sup>2</sup>	35,0	25,5*	16,0*	6,5*	35,0
Mistura de vitaminas <sup>2</sup>	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0
L- cistina	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de colina	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Farelo de trigo	50,0	43,5*	37,0*	30,5*	50,0
Sacarose	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Amido de milho <sup>3</sup>	609,5	613,5	597,0	533,0	729,5

<sup>1</sup>Para obtenção de 10% de proteína, valor mínimo necessário ao desenvolvimento de roedores, as dietas experimentais S1 e S2 foram suplementadas com caseína;

<sup>2</sup>Preparado conforme AIN-93G (Reeves et al., 1993);

<sup>3</sup>Adicionado para completar a dieta;

\*Descontada a quantidade intrínseca presente na microalga.

#### Avaliação nutricional

Foram realizadas as seguintes determinações para avaliação da qualidade protéica das dietas em estudo: Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), dado pela razão entre o ganho de peso (g) e a quantidade total de dieta ingerida durante o experimento (g); e Quociente de Eficiência Protéica (PER), calculado através da razão entre ganho de peso (g) e a quantidade total de proteína consumida (g) (SGARBIERI, 1996).

#### Análise hematológica e bioquímica

Ao término do experimento, após os animais serem submetidos a um jejum de 12h, foi realizada sedação em cânula com éter etílico, sendo imediatamente feita coleta de sangue por punção cardíaca. Cerca de 1mL do sangue foi disposto em *ependorf* com anticoagulante EDTA e destinado para análise de hemograma em contador hematológico automático (POCH-100iVDIFF, SYSMEX®); o restante



centrifugado a 1000g x 15 min a 4°C em tubos de ensaio para obtenção do soro que foi armazenado a -18°C (LEMOS, 1999) para posterior análise em avaliador bioquímico LabMax 240 (LABTEST DIAGNÓSTICA S.A.).

#### Análise estatística

Foram realizadas análises de variância (ANOVA), seguidas do teste de Tukey para comparação entre as médias num nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ), utilizando-se o *software* Statística 7.0 (Statsoft, EUA).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme visto na Tab. 2, após período de desnutrição (Fase I), os ratos dos diferentes grupos apresentaram pesos iniciais próximos, evidenciando uma distribuição uniforme entre os quatro tratamentos para posterior recuperação protéica (Fase II). Pesos finais e ganhos de peso total também não apresentaram diferença significativa.

Em relação ao consumo alimentar observa-se que o grupo S3 apresentou valores superiores ao C ( $p \leq 0,05$ ), no entanto diferiu negativamente quanto ao PER. Apesar de o consumo ter sido inferior no tratamento S1, este diferiu positivamente dos demais ( $p \leq 0,05$ ) quanto ao CEA e PER, demonstrando melhor eficiência. Segundo Chaud; Sgarbieri & Vicente (2008) a redução da eficiência alimentar ocorre devido à diminuição metabólica do organismo frente à determinada dieta, causando estagnação ou redução do peso corporal.

Mitchell et al. (1990), após tratarem ratos *Wistar* machos durante 60 dias para avaliar o efeito de diferentes concentrações (0%; 2,7%; 10,7%; 18,7% e 26,7%) de *S. máxima* sob os níveis de vitaminas A e E, constataram que o CEA foi inversamente proporcional à ingestão da biomassa. Rogatto et al. (2004) analisaram uma dieta com 17% de *Spirulina* em substituição total à proteína da dieta controle (caseína) em ratos machos jovens *Wistar* durante cinco semanas e obtiveram CEA de 0,21, valor este semelhante ao encontrado nos tratamentos com 17,6% e 26,4% de *Spirulina* (0,23 e 0,22; respectivamente) neste trabalho. De acordo com Vieira & Bion (1998) proteínas originadas de diferentes misturas e usadas em diferentes proporções podem resultar em variações nas concentrações de aminoácidos limitantes, os quais interferem na sua eficiência e utilização pelo homem e animais.

Tabela 2. Respostas ponderais e nutricionais de ratos *Wistar* desnutridos após recuperação por 30 dias com dieta C (controle), S1 (8,8% de *Spirulina*), S2 (17,6% de *Spirulina*), S3 (26,4% de *Spirulina*)

Determinação	Tratamentos*			
	C	S1	S2	S3
Peso inicial (g)**	56,00±7,80 <sup>a</sup>	54,40±4,95 <sup>a</sup>	56,33±3,90 <sup>a</sup>	54,65±13,30 <sup>a</sup>
Peso final (g)	189,35±11,50 <sup>a</sup>	200,00±40,65 <sup>a</sup>	165,00±12,25 <sup>a</sup>	188,00±15,45 <sup>a</sup>
Ganho de peso (g)	118,35±13,30 <sup>a</sup>	130,00±34,35 <sup>a</sup>	97,00±11,20 <sup>a</sup>	117,00±14,10 <sup>a</sup>
Consumo alimentar (g)	407,95±46,20 <sup>ab</sup>	439,20±66,40 <sup>b</sup>	560,65±16,60 <sup>ac</sup>	626,45±34,30 <sup>c</sup>
Vértice-cóccix (cm)	19,30±0,90 <sup>a</sup>	19,90±1,15 <sup>a</sup>	19,35±0,60 <sup>a</sup>	20,05±1,15 <sup>a</sup>
Membros torácicos (cm)	12,35±0,70 <sup>a</sup>	12,30±0,85 <sup>a</sup>	11,65±1,05 <sup>a</sup>	12,50±0,80 <sup>a</sup>
Circunferência abdominal (cm)	13,75±0,70 <sup>ab</sup>	14,90±1,15 <sup>b</sup>	12,50±1,00 <sup>a</sup>	12,60±1,15 <sup>a</sup>
Gordura corporal/peso	0,012±0,005 <sup>a</sup>	0,022±0,013 <sup>a</sup>	0,020±0,007 <sup>a</sup>	0,019±0,008 <sup>a</sup>
Fígado/peso	0,035±0,004 <sup>a</sup>	0,035±0,002 <sup>a</sup>	0,030±0,006 <sup>a</sup>	0,033±0,001 <sup>a</sup>
CEA	0,18±0,01 <sup>a</sup>	0,25±0,05 <sup>b</sup>	0,15±0,02 <sup>a</sup>	0,17±0,01 <sup>a</sup>
PER	2,10±0,13 <sup>a</sup>	2,75±0,40 <sup>b</sup>	2,00±0,25 <sup>a</sup>	1,60±0,15 <sup>c</sup>

Média ± desvio padrão;

Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ );

\* Tratamentos C, S2 e S3 (n=6), S1 (n=5);

\*\*Após 5 dias de adaptação.

O tratamento S1 diferiu ( $p \leq 0,05$ ) ainda dos demais adicionados de *Spirulina* em relação à circunferência abdominal, apresentando valores superiores, no entanto foi semelhante ao tratamento controle. Apesar do tratamento S1 ter apresentado maiores valores para circunferência abdominal, não diferiu significativamente quanto à relação de gordura corporal por peso corpóreo, demonstrando não ter havido acúmulo de tecido adiposo na região abdominal induzido pelo consumo da alga e do óleo de soja utilizado na elaboração das dietas

(Tab. 1). Os grupos não apresentaram diferença significativa também entre os demais parâmetros ponderais (comprimento do vértice-cóccix, medida dos membros torácicos e relação peso fígado/peso corpóreo).

Após 5 semanas de estudo com ratos *Wistar* machos alimentados com *Spirulina*, Rogatto et al. (2004) encontraram valores médios de vértice-cóccix iguais a 24,6cm. Silva (2009) obteve medidas dos membros torácicos em torno de 11,90cm para ratos fêmea *Wistar* alimentados com a AIN93G. A fim de verificar algum dano hepatocelular proveniente da dieta determinou-se a relação peso fígado (g)/peso corpóreo (g), obtendo-se valores na faixa de  $0,033 \pm 0,003$  –  $0,034 \pm 0,003$ , os quais não apresentaram diferença significativa e estão em acordo com outros estudos (CABALLERO-CÓRDOBA, 1997; SHONS et al., 2009; SILVA, 2009). De forma geral, os resultados apresentados na Tab. 2 evidenciam que a dieta com menor quantidade de *Spirulina*, apesar de um menor consumo, apresentou respostas nutricionais mais elevadas e conseqüentemente maiores valores nas respostas relacionadas ao desenvolvimento dos animais, mesmo quando não significativos.

Biomassas microalgais possuem elevados teores de ácidos nucléicos, os quais têm sido relatados como cerca de 4-6%. Devido à inabilidade do organismo humano para metabolizar o ácido úrico proveniente do metabolismo das purinas, o aumento no consumo de ácidos nucléicos pode levar a altos níveis de ácido úrico no soro. Assim, podendo promover o aparecimento de enfermidades como a gota (BECKER, 1988; ARAUJO; FACCHINETTI & SANTOS, 2003).

Os valores para ácido úrico (Tab. 3), se for tomada como referência a faixa de variação  $1,2 - 7,5 \text{mg.dL}^{-1}$  descrita como padrão para ratos (MITRUKA & RAWNSLEY, 1981), estão todos dentro da faixa de normalidade. Da mesma forma, quando comparado a valores obtidos ( $1,77 \text{mg.dL}^{-1}$ ) em estudo com ratos machos *Wistar* por Vilela; Sgarbieri & Alvim (2000).

A fração de nitrogênio não protéico no soro ou no sangue é composta por todas as substâncias nitrogenadas que não sejam proteínas. Seu principal componente é a uréia, a qual é sintetizada no fígado a partir da amônia derivada predominantemente de proteínas e aminoácidos, sendo o recurso mais utilizado para avaliação do funcionamento renal de mamíferos (DEVLIN, 2007).

Tabela 3. Respostas dos níveis bioquímicos do sangue de ratos *Wistar* desnutridos após recuperação por 30 dias com dieta C (controle), S1 (8,8% de *Spirulina*), S2 (17,6% de *Spirulina*), S3 (26,4% de *Spirulina*)

Determinação	Tratamentos*			
	C	S1	S2	S3
Ácido úrico (mg.dL <sup>-1</sup> )	1,55±1,00 <sup>a</sup>	1,90±0,90 <sup>a</sup>	1,30±0,90 <sup>a</sup>	1,40±1,45 <sup>a</sup>
Uréia(mg.dL <sup>-1</sup> )	69,00±10,70 <sup>a</sup>	66,20±23,70 <sup>a</sup>	66,65±14,40 <sup>a</sup>	55,50±8,00 <sup>a</sup>
Creatinina (mg.dL <sup>-1</sup> )	0,32±0,05 <sup>abc</sup>	0,37±0,04 <sup>b</sup>	0,27±0,04 <sup>c</sup>	0,38±0,06 <sup>ab</sup>
Proteínas totais (g.dL <sup>-1</sup> )	6,10±0,15 <sup>bc</sup>	6,60±0,25 <sup>b</sup>	5,85±0,50 <sup>c</sup>	5,85±0,30 <sup>c</sup>
Albumina (g.dL <sup>-1</sup> )	3,22±0,15 <sup>a</sup>	3,45±0,15 <sup>a</sup>	3,20±0,30 <sup>a</sup>	3,17±0,20 <sup>a</sup>
AST(u/L)	33,15±13,60 <sup>a</sup>	32,20±7,50 <sup>a</sup>	47,33±34,20 <sup>a</sup>	32,00±7,95 <sup>a</sup>
ALT (u/L)	392,50±276,85 <sup>a</sup>	424,20±242,45 <sup>a</sup>	296,15±202,30 <sup>a</sup>	232,85±111,45 <sup>a</sup>
Glicose (mg.dL <sup>-1</sup> )	68,00±15,45 <sup>a</sup>	83,20±18,80 <sup>a</sup>	65,85±9,80 <sup>a</sup>	69,00±22,65 <sup>a</sup>
Colesterol total (mg.dL <sup>-1</sup> )	80,50±14,65 <sup>a</sup>	74,00±18,45 <sup>a</sup>	103,50±10,50 <sup>b</sup>	86,85±11,95 <sup>ab</sup>
HDL(mg.dL <sup>-1</sup> )	32,85±3,50 <sup>a</sup>	29,80±6,10 <sup>a</sup>	35,65±4,05 <sup>a</sup>	31,35±3,70 <sup>a</sup>
LDL(mg.dL <sup>-1</sup> )	29,50±10,70 <sup>a</sup>	30,25±15,60 <sup>a</sup>	51,95±6,70 <sup>b</sup>	40,80±8,35 <sup>ab</sup>
LDL/HDL	0,85±0,23 <sup>a</sup>	0,95±0,35 <sup>a</sup>	1,45±0,25 <sup>b</sup>	1,30±0,15 <sup>ab</sup>
VLDL(mg.dL <sup>-1</sup> )	17,85±4,60 <sup>a</sup>	13,95±2,60 <sup>a</sup>	16,10±5,30 <sup>a</sup>	14,70±5,30 <sup>a</sup>
Triacilgliceróis (mg.dL <sup>-1</sup> )	89,35±23,00 <sup>a</sup>	69,80±12,75 <sup>a</sup>	80,50±26,50 <sup>a</sup>	73,50±26,55 <sup>a</sup>
Ferro(µg.dL <sup>-1</sup> )	93,33±13,25 <sup>a</sup>	116,40±28,35 <sup>a</sup>	93,15±52,25 <sup>a</sup>	79,85±17,15 <sup>a</sup>

Média de 6 repetições ±desvio padrão;

Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ );

\*Tratamentos C, S2 e S3 (n=6), S1 (n=5);

AST: aspartato aminotransferase;

ALT: alanina aminotransaminase.

De acordo com Miller (1993), níveis baixos de uréia podem ser indicativos de insuficiência hepática grave, nefrose, desnutrição e/ou hemodiluição, o que não ocorreu

neste trabalho, pois apesar dos animais pertencentes aos grupos que consumiram as dietas com *Spirulina* apresentarem níveis séricos de uréia mais baixos em relação ao grupo controle, a diferença não foi significativa. É preconizado por Ori; Seguro & Rocha (1990) níveis séricos de uréia em ratos em torno de  $300\text{mg.dL}^{-1}$  para que seja diagnosticada insuficiência renal, o que não ocorreu com os grupos do presente estudo.

Para fins de avaliação do funcionamento renal é bastante pertinente realizar a determinação dos níveis de creatinina juntamente com de uréia, pois seus níveis aumentam à medida que ocorre a diminuição do funcionamento dos rins (MILLER, 1993). Ao analisar a Tab. 3 observa-se que todos os tratamentos com *Spirulina* apresentaram níveis de creatinina estatisticamente semelhantes ao controle, no entanto, ao comparar entre si os tratamentos com *Spirulina* nota-se que S2 apresentou valores significativamente menores ( $p \leq 0,05$ ). Neste estudo, verificou-se que os níveis de creatinina ficaram numa faixa de  $0,27 - 0,38\text{mg.dL}^{-1}$ , valores estes considerados normais por Mitruka & Rawnsley (1981).

A determinação de proteínas plasmáticas no soro fornece importantes dados acerca de condições clínicas, podendo a sua diminuição ser um indicativo de restrição no aporte de aminoácidos pelo consumo de dietas pobres em proteína ou pela ingestão de alimentos com conteúdo protéico satisfatório, mas contendo fatores que dificultam os processos de digestão e absorção (CAMPELLO; CARVALHO & VIEIRA, 2009). Os valores encontrados para proteínas plasmáticas totais estão na faixa  $6,85$  a  $6,60\text{g.dL}^{-1}$ , onde todos os tratamentos com *Spirulina* foram semelhantes ao controle, porém com algumas diferenças entre si ( $p \leq 0,05$ ). Em relação à albumina os grupos não diferiram. Estes resultados se aproximam daqueles obtidos por Quevedo et al. (2002) e Rogatto et al. (2004) em estudos com ratos machos alimentados com dietas à base de *Chlorella vulgaris* e *Spirulina*, respectivamente.

Os níveis séricos das atividades da aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransaminase (ALT) não revelaram valores estatisticamente diferentes aos do grupo controle. No entanto, todos os grupos, inclusive o controle, apresentaram valores de AST superiores aos valores de referência de outros estudos em condições semelhantes a este (CABALLERO-CÓRDOBA, 1997; VILELA, SGARBIERI & ALVIM, 2000; ANTHONY et al., 2006; MELO et al., 2008). Com relação à ALT os resultados encontrados são muito semelhantes aos dos autores citados anteriormente. Segundo Devlin (2007), a ALT ocorre nos hepatócitos em concentrações mais elevadas que a

AST, portanto, a determinação de sua atividade no soro sanguíneo é um diagnóstico de lesão hepática mais eficaz.

Os grupos não diferiram em relação aos teores de glicose sanguínea, com respostas , entre 65,65 e 83,20mg.dL<sup>-1</sup>. Em estudo semelhante realizado por Alves; Voltarelli & Mello (2005), o efeito da *Spirulina* sobre o músculo esquelético de ratos desnutridos foi avaliado. Estes autores encontraram valores em torno de 105mg.dL<sup>-1</sup> após 30 dias de tratamento. Rogatto et al. (2004) encontraram, em ratos machos *Wistar* alimentados com *Spirulina*, cerca de 73mg.dL<sup>-1</sup> para glicose sanguínea. Segundo Mitruka & Rawnsley (1981) *Rattus norvegicus* que apresentam níveis de glicose compreendidos na faixa 50-135mg.dL<sup>-1</sup> podem ser considerados saudáveis.

Dentre as respostas bioquímicas do sangue dos animais analisados no presente estudo, as relacionadas aos lipídios séricos foram as que mais apresentaram diferença significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os tratamentos. O tratamento S2 apresentou valores superiores ( $p \leq 0,05$ ) ao controle para colesterol total; LDL e a relação LDL/HDL. Os teores de colesterol total para este tratamento foram superiores aos relatados como normais (56 a 76mg.dL<sup>-1</sup>) por Souza-Soares; Machado & Rodrigues (2009) e também aos obtidos por Bertolin et al. (2009). Estes últimos autores, após tratar ratos *Wistar* machos por 60 dias com dieta hipercolesterolêmica e *Spirulina*, encontraram 99,1mg.dL<sup>-1</sup> e 65,1mg.dL<sup>-1</sup> para colesterol total em ratos submetidos à dieta hipercolesterolêmica durante 30 dias e dieta com *Spirulina* por mais 30 dias, nesta ordem.

Assim como para o colesterol total, os valores para LDL também se apresentaram elevados ( $p \leq 0,05$ ) nos animais do tratamento S2, no entanto este fato é esperado uma vez que essa fração representa cerca de dois terços do colesterol total (MILLER, 1993). Já os valores de HDL (29,80 a 35,65mg.dL<sup>-1</sup>) obtidos nesta pesquisa não diferiram entre si e apresentaram-se próximos ao encontrados por Bertolin et al. (2009) em ratos submetidos à dieta hipercolesterolêmica e posteriormente à dieta com *Spirulina* (32,3mg.dL<sup>-1</sup>).

A relação LDL/HDL é comumente calculada para avaliar o risco de doenças coronarianas. De acordo com relatos mencionados por Ho et al. (2003), elevada concentração de LDL evidencia processos aterogênicos, enquanto que alto nível de HDL tem efeito cardioprotetor. Neste estudo as relações LDL/HDL foram de 0,85; 0,95; 1,45 e 1,30 para os grupos C,S1, S2 e S3, respectivamente. Embora ainda não tenha sido determinada a relação entre as lipoproteínas LDL e HDL para roedores e o valor

estipulado para humanos não possa ser comparado diretamente, convencionou-se que esta relação LDL/HDL seja a mais reduzida possível (Silva, 2009). Portanto, a relação obtida para os animais alimentados com a dieta S2 foi aumentada em relação à dieta C ( $p \leq 0,05$ ).

Valores de VLDL e triacilgliceróis não diferiram entre os tratamentos. Conforme apresentado na Tab. 3, os valores encontrados para a fração VLDL foram 17,85; 13,25; 16,10 e 14,703mg.dL<sup>-1</sup> para os tratamentos C, S1, S2 e S3, respectivamente. Os maiores teores de VLDL (C e S2), apesar de não haver diferença significativa, coincidem com os valores de colesterol total e triacilgliceróis. Os níveis da fração VLDL são proporcionais aos de colesterol total e triacilgliceróis, pois os mesmos compõem a fração em 60 e 20%, respectivamente.

Os resultados encontrados demonstram que, apesar do tratamento com 8,8% de *Spirulina* (S1) ter apresentado valores de triacilgliceróis (TAG) mais baixos, não houve diferença significativa entre os quatro tratamentos. A média de TAG entre os grupos foi de 78,28mg.dL<sup>-1</sup>, valor inferior aos obtidos por Cerqueira et al. (2008) e Bertolin (2009) em ratos *Wistar* machos.

Os grupos teste não apresentaram diferença significativa para o teor de ferro. De acordo com o Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, ratos (*Rattus norvegicus*) adultos da linhagem *Wistar* devem apresentar teor de ferro na faixa de 154 a 279µg.dL<sup>-1</sup> (FMUSP, 2010, 2010). Estes dados são confirmados pelo estudo de Santos; Madruga & Bion (2004), os quais encontraram 254µg.dL<sup>-1</sup> de ferro em ratos submetidos à recuperação protéica com dieta de caseína durante 28 dias.

O valor do hematócrito reflete a massa total de células na unidade de volume de sangue, mostrando fundamental importância no estudo de todos os tipos de anemia, além disso, seus resultados estão menos sujeitos a erros do que a contagem de hemácias (MILLER, 1993). Neste trabalho, os tratamentos não diferiram quanto aos níveis de hematócrito com resultados semelhantes aos de outros estudos (BOAVENTURA et al., 2003; DUARTE et al., 2009) e dentro da faixa descrita por HARKNESS & WAGNER (1993) para roedores, entre 36 e 48%.

Os grupos não diferiram relativamente à hemoglobina cujos níveis podem ser considerados normais quando comparados com outros estudos. Harkness & Wagner (1993) relatam que valores médios de hemoglobina para roedores oscilam de 11 a 18%. Kappor & Mehta (1993) testaram o uso de *Spirulina* numa concentração

semelhante ao tratamento S3 (24%) em associação com produtos vegetais e encontraram teores de hemoglobina aumentados.

Volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCH) indicam o tamanho das hemácias e a concentração de hemoglobina dentro das hemácias, respectivamente. Os grupos estudados não diferiram entre si e os valores encontrados para VCM são semelhantes aos encontrados em ratos alimentados com dietas adicionadas de *Spirulina platensis* por Marco (2009). Em relação aos níveis de HCM, a dieta S2 resultou em valores inferiores ( $p \leq 0,05$ ) aos dos grupos C e S1. Santos; Madruga & Bion (2004); Duarte et al. (2009) e Marco (2008) encontraram valores inferiores aos do presente estudo.

Eritrócitos ou hemácias são os elementos figurados presentes em maiores quantidades no sangue e sua baixa contagem indica deficiência em ferro e estado anêmico. Para os grupos C, S1, S2 e S3 foram encontrados valores que estão compreendidos na faixa sugerida por Sanchis & Silbiger (1986), citado por Souza-Soares; Machado & Rodrigues (2009), de 7 a 10 milhões/mm<sup>3</sup>. Marco (2008) adicionando somente 2% de *Spirulina platensis* às dietas ofertadas a ratas *Wistar*, conclui que há viabilidade de utilização de multimisturas adicionadas da microalga frente à prevenção de anemia ferropriva.

Em relação às plaquetas, componentes responsáveis pela coagulação do sangue, os valores encontrados (85 – 1087 mil/mm<sup>3</sup>) são superiores aos da literatura. Sanchis & Silbiger (1986), citado por Souza-Soares; Machado & Rodrigues (2009), preconizam valores entre 702 e 796 mil/mm<sup>3</sup> e Duarte et al. (2009) uma faixa de 720 a 746 mil/mm<sup>3</sup> para ratos saudáveis. Essa elevação não necessariamente indica algum problema no sangue dos animais. Considerando que a contagem das plaquetas foi automatizada (CAP) e que de acordo com Van der Meer; Mackenzie & Dinnissen (2003) e Comar, Danchura e Silva (2009), apesar desta técnica ser mais precisa e exata que a contagem de plaquetas por microscopia (COM), há um risco potencial para contagens falsamente baixas ou altas. Fragmentos eritrocitários, fragmentos citoplasmáticos de células leucêmicas, micrócitos com volume próximo ao limite de corte, lipemia, bactérias e leveduras podem conduzir a resultados falsamente aumentados.



Tabela 4. Respostas dos índices hematológicos do sangue de ratos *Wistar* desnutridos após recuperação por 30 dias com dieta C (controle), S1 (8,8% de *Spirulina*), S2 (17,6% de *Spirulina*), S3 (26,4% de *Spirulina*)

Determinação	Tratamentos*			
	C	S1	S2	S3
Leucócitos t (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	4,64±1,95 <sup>a</sup>	5,50±2,05 <sup>a</sup>	5,08±1,08 <sup>a</sup>	4,75±2,05 <sup>a</sup>
Linfócitos (%)	80,40±4,45 <sup>a</sup>	85,00±4,35 <sup>ab</sup>	88,65±2,75 <sup>b</sup>	84,00±4,75 <sup>ab</sup>
Monócitos (%)	2,40±1,35 <sup>a</sup>	1,20±0,85 <sup>a</sup>	1,85±1,70 <sup>a</sup>	3,50±1,20 <sup>a</sup>
Basófilos (%)	0	0	0	0
Eosinófilos (%)	1,40±1,65 <sup>a</sup>	0,20±0,45 <sup>a</sup>	0,50±0,55 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
Hematócrito (%)	42,60±0,85 <sup>a</sup>	44,00±1,90 <sup>a</sup>	45,10±1,80 <sup>a</sup>	42,00±6,45 <sup>a</sup>
Hemoglobina (%)	13,85±0,15 <sup>a</sup>	14,75±0,60 <sup>a</sup>	14,20±0,60 <sup>a</sup>	13,40±1,85 <sup>a</sup>
VCM (%)	59,95±1,75 <sup>a</sup>	60,72±0,50 <sup>a</sup>	59,10±1,85 <sup>a</sup>	61,20±2,05 <sup>a</sup>
HCM (%)	32,50±0,75 <sup>ab</sup>	32,65±0,20 <sup>ab</sup>	31,50±0,55 <sup>c</sup>	31,70±0,50 <sup>ac</sup>
Eritrócitos (10 <sup>6</sup> /mm <sup>3</sup> )	7,10±0,25 <sup>a</sup>	7,25±0,30 <sup>a</sup>	7,65±0,25 <sup>a</sup>	7,00±1,00 <sup>a</sup>
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	1087,00±210,7 <sup>a</sup>	981,80±92,7 <sup>a</sup>	1149,65±162,4 <sup>a</sup>	850,35±285,5 <sup>a</sup>

Letras distintas na mesma linha indicam diferença significativa entre os grupos pelo teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ); \* Tratamentos C, S2 e S3 (n=6), S1 (n=5).

Os elementos figurados incolores do sangue dos mamíferos são conhecidos como leucócitos e desempenham papel essencial no mecanismo de defesa do organismo contra ações infecciosas (MILLER, 1993). Os tratamentos não apresentaram diferença para leucócitos totais (Tab. 4), no entanto os valores encontram-se levemente abaixo do limite inferior preconizado por Sanchis & Silbiger

(1986 apud Souza-Soares; Machado & Rodrigues, 2009), ou seja, 6000 a 17000/mm<sup>3</sup> e ainda quando comparado ao estudo de Santos; Madruga & Bion (2004), os quais encontraram 6350 leucócitos/mm<sup>3</sup>. Dentre os leucócitos totais os linfócitos estão presentes em níveis mais elevados, representando cerca de 50 a 95% (ANTHONY et al, 2006). Desse modo os valores obtidos se enquadram com o recomendado, visto que os grupos C, S1, S2 e S3 apresentam 80,4; 85,0; 88,65 e 84,0%, respectivamente.

Nos resultados encontrados neste trabalho para níveis de monócitos não se verificou diferença significativa entre os grupos. De acordo com Sanchis & Silbiger (1986 apud Souza-Soares; Machado & Rodrigues, 2009), os monócitos representam 0 a 3% dos leucócitos totais. Santos; Madruga & Bion (2004) e Duarte et al. (2009), que avaliaram níveis da série branca em ratos *Wistar* jovens e machos, encontraram valores na faixa de 1,2 a 2,7%.

Basófilos desempenham importante papel nas respostas imunitárias corporais, pois ao menor contato com uma substância alergênica liberam mediadores químicos, como a histamina, a qual atrai as demais células de defesa (MILLER, 1993). Sanchis & Silbiger (1986 apud Souza-Soares; Machado & Rodrigues, 2009) e Anthony et al. (2006) preconizam como valores normais a faixa entre 0 e 1% de basófilos, os quais não foram detectados nos animais em estudo, para todos os tratamentos.

Segundo Feldman et al. (2000), a função primordial dos eosinófilos é combater substâncias tóxicas e portanto estarão presentes em maior quantidade nos locais onde ocorrem reações antígeno - anticorpo e nos pontos de penetração de substâncias estranhas ao organismo. De acordo com Sanchis & Silbiger (1986 apud Souza-Soares; Machado & Rodrigues, 2009) e Anthony et al. (2006), eosinófilos devem estar presentes em torno de 0 a 3%. Os resultados obtidos nos mesmos estão dentro da faixa considerada normal, sem diferença entre os tratamentos.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os resultados do presente estudo demonstram que as diferentes concentrações de *Spirulina* cepa LEB-18 (8,8, 17,6 e 26,4%) permitiram a recuperação nutricional de ratos *Wistar*/UFPel, relativamente aos efeitos fisiológicos, bioquímicos e hematológicos estudados. A dieta com 8,8% de *Spirulina* foi a mais eficiente, apresentando respostas equivalentes ao controle e superiores aos demais.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo projeto de indução PRÓ-ENGENHARIA da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

## REFERÊNCIAS

- ÁGUILA, M. B.; APFEL, M. I. R.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Comparação morfológica e bioquímica entre ratos envelhecidos alimentados com dieta hiperlipídica e com óleo de canola. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 68, n. 3, p. 155-161, 1997.
- ALVES, C. R.; VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R. *Spirulina* como fonte protéica na recuperação de ratos desnutridos: efeito sobre o músculo esquelético. **Rev. Digital de Lecturas, Educación Física y Deportes**, ano 10, n. 86, 2005. Disponível em: <http://www.efdeportes.com/efd86/spirulin.htm> Acesso em: outubro de 2010.
- ANTHONY, J. C. M.; MERRIMAN, T. N.; HEIMBACH, J. T. 90-Day oral (gavage) study in rats with galactooligosaccharides syrup. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 819-826, 2006.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis. **Official Methods of Analysis**, 17ª Edição, Washington, D. C., CD-ROM, 2000.
- ARAÚJO, K. G. de L.; FACCHINETTI, A. D.; SANTOS, C. P. dos. Influência da ingestão de biomassas de *Spirulina* (*Arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n. 1, p. 6-9, 2003.
- BECKER, E. W. Microalgae for human and animal consumption. In *Microalgal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 222-255p.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**. v. 25, p. 207-210, 2007.
- BELAY, A. O. Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **J Appl Phycol**, v. 5, p. 235-241, 1993.
- BERTOLIN, T. E.; PILATTI, D.; GIACOMINI, A. C. V. V.; BAVARESCO, C. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. **Braz. Arch. Biol. Technol.** v. 52, n. 5, p. 1253-1259, 2009.

- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
- BOAVENTURA, G. T.; SILVA, R. H. L.; TOSTES, L. F.; AZEREDO, V. B. Ganho de peso, hemoglobina e hematócrito de ratos recebendo dieta de Quissimã, RJ, com ou sem suplemento alimentar alternativo. *Revista de Nutrição*, v. 16, n. 3, p. 321-331, 2003.
- BRASIL. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - Lista dos Novos Ingredientes aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária em maio de 2009.
- CABALLERO-CÓRDOBA, G. B. **Levedura de cervejaria: composição, valor protéico e avaliação de toxicidade subcrônica em células íntegras, células mecanicamente rompidas e concentrado protéico**. Campinas, 1997. 164p.Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Campinas.
- CAMPELLO, C. C., CARVALHO, V. L.; VIEIRA, K. M. Desempenho e parâmetros séricos de ratos alimentados com dietas contendo soja integral crua. **Braz J Vet Anim Sci**, v. 46, n. 3, p. 188-198, 2009.
- CERQUEIRA, P. M.; FREITAS, M. C. J.; PUMAR, M.; SANTANGELO, S. B. The pumpkin (*Cucurbita maxima*, L.) seed flour effect on the rat glucose and lipid metabolism. **Rev. Nutr.**, v. 21, n. 2, p.129-136, 2008.
- CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C.; VICENTE, E. Influence of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell wall fractions on some nutritional parameters of growing rats. **Rev. Nutr.**, v. 21, n. 2, p. 137–147, 2008.
- COMAR, S. R.; DANCHURA, H. S. M.; SILVA, P. H. Platelet count: evaluation of manual methodologies and application in the laboratory routine. **Rev Bras de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 6, 2009.
- CORY, J. G. Metabolism of purine and pyrimidine nucleotides. In: DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 6ª Edição. São Paulo: Edgard Blucher, 2007. 770-785p.
- DEVLIN, T. M. Textbook of biochemistry – with clinical correlations. São Paulo: Edgard Blucher, 2007. 1186p.
- DUARTE, S. M. da S.; ABREU, C. M. P. de; MENEZES, H. C.; PAULA, F. B. de A.; PEREIRA, R. G. F. A.; GOUVEA, C. M. C. P. Peeled coffee brew effect in the

- antioxidant activity hematological and biochemical parameters in rats. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 29, n. 4, p. 703-708, 2009.
- FDA - Food and Drug Administration (2003). Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>. Acesso: outubro de 2010.
- FELDMAN, B. F.; ZINKL, I. G.; JAIN, N. C. **Schalm's – Veterinary Hematology**. 5ª Edição. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.
- FMUSP – Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Disponível em: <http://www.biot.fm.usp.br/site1/index-2.html>. Acesso: outubro de 2010.
- HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biology and clinical of rabbits and rodents**. 3ª Edição. São Paulo, Roca, 1993. 238p.
- HO, H.M.; LEUNG, L.K.; CHAN, F.L.; HUANG, Y.; CHEN, Z.Y. Soy leaf lowers the ratio of non-HDL to HDL cholesterol in hamsters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.4554-4558, 2003.
- JOOD, S.; SINGH, M. Amino acid composition and biological evaluation of the protein quality of high lysine barley genotypes. *Plant Food for Human Nutrition*, 2001.
- KAPPOR, S. J.; MEHTA, U. Iron Status and growth of rats fed different dietary iron sources. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 44, n. 1, p.29-34, 1993.
- LEMONS, M. R. B. **Estudo comparativo de três farelos de arroz. Respostas biológicas e nutricionais, testadas em ratos *Wistar***. Rio Grande, 1999. 112p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.
- MARCO, P. L. **Avaliação da biodisponibilidade de nutrientes em multimisturas acrescidas de *Spirulina platensis***. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande do Sul.
- MELO, D. S. de; CORRÊA, A. D.; MARCOS, F. C. A.; SOUSA, R. V.; ABREU, C. M. P. de; SANTOS, C. D. Effects of cassava leaves flour on the AST, ALT, ALP enzymes activity and hepatic lipids of *Wistar* rats. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, p. 32-37, 2008.
- MILLER, D. S.; BENDER, A. E. The determination of the net protein utilization of proteins by a hortened method. **British Journal of Nutrition**, v. 9, 382–388, 1955.
- MILLER O. **Laboratório para o clínico**. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 1993. 493p.

- MINISTÉRIO DA SAÚDE (2010) Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id\\_area=124&CO\\_NOTICIA=11662](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11662) Acesso em: outubro de 2010.
- MITCHELL, G. V.; GRUNDEL, E.; JENKINS, M.; BLAKELY, S. R. Effects of graded dietary levels of *Spirulina maxima* on vitamins A and E in male rats. **J Nutr.**, v. 120, p. 1235-1240, 1990.
- MITRUKA, M. B.; RAWNSLEY, H. M. **Clinical, biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans**. 2ª Edição. New York: Masson Publishing, 1981. 314p.
- MOLINA, G. E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN-FERNANDEZ, F. G. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. **Biotechnology Advances** v. 20, p. 491–515, 2002.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Z. Naturforsch.** v. 63, p.144–150, 2008.
- ORI, M.; SEGURO, C. A.; ROCHA, A. S. Efeito inibidor do soro de ratos com insuficiência renal aguda e crônica sobre a atividade fagocitária “*in vitro*”. **Revista Inst. Med.** v. 32, p. 409-413, 1990.
- PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **J. Food Eng.** v. 56, p. 371–375, 2003.
- QUEVEDO, H. J. M.; QUINTANA, L. B.; MANRIQUE, C. E. M.; FARNÉS, O. C. Aspectos bioquímicos de La recuperación de ratones Balb/C malnutridos com um hidrolizado protéico de *Chlorella vulgaris*. **Rev. Cubana Aliment. Nutri.**, v. 16, n. 1, p. 5-12, 2002.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76 Rodent Diet. **Rodent Diet**, v. 123, n. 6, p.1939-1951, 1993.
- ROGATTO, G. P.; OLIVEIRA, C. A. M. de; SANTOS, J. W. dos; MACHADO, F. de B.; NAKAMURA, F. Y.; MORAES, C. de; ZAGATTO, A. de M.; FARIA, M. C.; AFONSO, M.; MELLO, M. A. R. de. Influência da ingestão de e *Spirulina* sobre o metabolismo de ratos exercitados. **Rev. Bras. Med. Esportiva**, v. 10, n. 4, 2004.
- SANCHIS, F. S.; SILBIGER, H. L. N. **Animais de Laboratório** – PURINA. São Paulo: Purina Alimentos Ltda., 1986. 21p.

- SANTOS, H. B., MADRUGA, M. S., BION, F. M. Studies in rat: biochemical and hematological on bioavailability of minerals in diet enriched with "multimixture". **Science and Technology of Food**. v. 24, n. 4, p. 613-618, 2004.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificação**. São Paulo, Ed. Varela, 1996. 517p.
- SILVA, P. V. **Leite caprino: caracterização físico-química, perfil de ácidos graxos e avaliação biológica (ratos fêmeas Wistar)**. Pelotas, 2009. 156p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.
- SHONS, P. F.; LEITE, A. V.; NOVELLO, D.; BERNARDI, D. M.; MORATO, P. N.; ROCHA, L. M.; REIS, S. M. P. M.; MIYASAKA, C. K. Protein efficiency of lentil (*Lens culinares*) in development of *Wistar* rat. **Food and Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 255-260, 2009.
- SOUZA-SOARES, L. A.; MACHADO, M. R. G. e RODRIGUES, R. da S. **Experimentação com animais de laboratório: manual básico**. Pelotas, Ed. Universitária – UFPel, 2009. 468p.
- STATISTICA, Statsoft. (*data analysis software system*), version 7 for *Windows*. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).2004.
- VAN DER MEER, W.; MACKENZIE, M. A.; DINNISSEN, J. W. Pseudoplatelets: a retrospective study of their incidence and interference with platelet counting. **J Clin Pathol.**, v. 56, n. 10, p.772-774, 2003.
- VIEIRA, R. L. ; BION, F. M. Valor biológico de dieta à base de soja (*Glycine hispida*) e algaroba (*Prosopis juliflora*). **B. Ceppa**. v. 16, n. 1, p. 85-98, 1998.
- VILELA, E. S. D. ; SGARBIERI, V. C. Nutritive value of biomass of integral cells, autolysate and extract and yeast cells from beer. **Rev. Nutr.**, v. 16, p. 127-134, 2000.
- VON DER WEID, D.; DILLON, J. C.; FALQUET, J. **Malnutrition: a silent massacre**, 1ª Edição. Geneve: Antenna Technology, 2000.
- WHO – World Health Organization. (2010). Disponível em:< <http://www.who.int/en>> Acesso em: outubro de 2010.

## **CAPÍTULO IV**

### **CONCLUSÃO GERAL**



## 7 CONCLUSÃO GERAL

Em animais sadios, após 40 dias experimentais, as três concentrações (8,8; 17,6 e 26,4%w/w de *Spirulina*) foram capazes de promover o desenvolvimento corporal, como também não apresentaram possíveis efeitos adversos relacionados à ingestão de proteínas. Contudo, o tratamento S1 (8,8%w/w) apresentou respostas nutricionais, bioquímicas e hematológicas mais próximas ao grupo controle, enquanto que o tratamento S2 (17,6%w/w) elevou os níveis de lipídios plasmáticos.

Em animais desnutridos, após 30 dias sob ação das três concentrações (8,8; 17,6 e 26,4%w/w de *Spirulina*), a recuperação nutricional foi evidenciada no tratamento S1 (8,8%w/w), o qual promoveu um desenvolvimento corporal, como também não alterou significativamente níveis bioquímicos e hematológicos. O tratamento S2, em comparação com o tratamento controle, não proporcionou um desenvolvimento corporal tão adequado, bem como elevou os níveis de colesterol dos animais.

Em ambos os experimentos a concentração mais elevada de *Spirulina*, a S3 (26,4%w/w), mostrou-se semelhante às dietas C, S1 e S2, apresentando respostas intermediárias.

Os resultados do presente estudo demonstram que embora a microalga *Spirulina* seja uma fonte rica em nutrientes, um consumo superior ao limite estabelecido pela ANVISA não foi capaz de promover melhor desenvolvimento fisiológico, bioquímico e hematológico aos animais.

**CAPÍTULO V**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS**

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- ÁGUILA, M. B.; APFEL, M. I. R.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Comparação morfológica e bioquímica entre ratos envelhecidos alimentados com dieta hiperlipídica e com óleo de canola. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 68, n. 3, p. 155-161, 1997.
- ALVES, W. M. **Estudo hematológico e bioquímico do sangue de rato sob ação do cádmio em função do sexo**. França, 2006. 128p. Dissertação (Mestrado em Promoção da Saúde) – Universidade da França.
- ALVES, C. R.; VOLTARELLI, F. A.; MELLO, M. A. R. *Spirulina* como fonte protéica na recuperação de ratos desnutridos: efeito sobre o músculo esquelético. **Rev. Digital de Lecturas, Educación Física y Deportes**, ano 10, n. 86, 2005. Disponível em: <http://www.efdeportes.com/efd86/spirulin.htm> Acesso em: outubro de 2010.
- AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V.; COLLA, L. M. Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. **Revista de Ciência Básica Aplicada**. v. 29, n. 2, p. 109-117, 2008
- ANDRADE, M. da R.; COSTA, J. A. V. Cultivo da microalga *Spirulina platensis* em fontes alternativas de nutrientes. **Revista Ciênc. Agrotec.** Lavras. v. 32, n. 5, p. 1551-1556, 2008.
- ANUPAMA, P.; RAVINDRA, L. Value-added food: Single cell protein. **Biotechnology Advances**. n. 18. p. 459-479, 2000.
- ANTHONY, J. C. M.; MERRIMAN, T. N.; HEIMBACH, J. T. 90-Day oral (gavage) study in rats with galactooligosaccharides syrup. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 819-826, 2006.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists Official Methods of Analysis. **Official Methods of Analysis**, 17<sup>a</sup> Edição, Washington, D. C., CD-ROM, 2000.
- ARAÚJO, K. G. de L.; FACCHINETTI, A. D.; SANTOS, C. P. dos. Influência da ingestão de biomassas de *Spirulina* (*Arthrospira* sp.) sobre o peso corporal e consumo de ração em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 23, n. 1, p. 6-9, 2003.
- ARAÚJO, P. F. de. **Atividade antioxidante de néctar de amora-preta (*Rubus* spp.) e sua influência sobre os lipídios séricos, glicose sanguínea e peroxidação lipídica em Hamsters (*Mesocricetus auratus*) hipercolesterolêmicos**. Pelotas, 2009. 122p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

- AT-ATTAR, A. M. Antilithiatic influence of *Spirulina* on ethylene Glycol-induced nephrolithiasis in male rats. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**. v. 6. n. 1, p. 25-31, 2010.
- BECKER, E. W. Microalgae for human and animal consumption. In *Microalgal biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 222-255p.
- BECKER, E. W. Microalgae in human and animal nutrition. In: RICHMOND, A. (Ed). **Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology**. London: Blackwell Science, 2004. 312-351p.
- BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. **Biotechnology Advances**. v. 25, p. 207–210, 2007.
- BELAY, A. O. Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **J Appl Phycol**, v. 5, p. 235-241, 1993.
- BERNARD, H.; NEGRONI, L.; CHATEL, J. M. Molecular basis of IgE cross-reactivity between human  $\beta$ -casein and bovine  $\beta$ -casein, a major allergen of milk. **Molecular Immunology**. v. 37, p. 161-167, 2000.
- BERTOLIN, T. E.; PILATTI, D.; GIACOMINI, A. C. V. V.; BAVARESCO, C. S.; COLLA, L. M.; COSTA, J. A. V. Effect of microalga *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) on hippocampus lipoperoxidation and lipid profile in rats with induced hypercholesterolemia. **Braz. Arch. Biol. Technol**. v. 52, n. 5, p. 1253-1259, 2009.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.37, p.911-917, 1959.
- BOAVENTURA, G. T.; SILVA, R. H. L.; TOSTES, L. F.; AZEREDO, V. B. Ganho de peso, hemoglobina e hematócrito de ratos recebendo dieta de Quissimã, RJ, com ou sem suplemento alimentar alternativo. *Revista de Nutrição*, v. 16, n. 3, p. 321-331, 2003.
- BOROWITZKA, M., In: BOROWITZKA, M.; BOROWITZKA, L. **Microalgal Biotechnology**, 2ª edição, Sydney, p. 477, 1999.
- BOUDENE, C., E., Recherche et dosage de divers toxiques minereaux dans les algues spirulines de differentes origins, et evaluation de la toxicite a long terme chez le rat d'un lot algues spirulines de provenance Mexicaine. **Ann. Nutr. Alim**. V. 30, p. 577-588, 1976.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº. 33, de 25 de fevereiro de 2003. Dispões sobre o Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde, 2003.

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos - Lista dos Novos Ingredientes aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, maio de 2009.
- BRESSANI, R. The use of yeast in human foods. In **Single cell protein**. Massachussets: MTI Press, 1986. 480p.
- BURJA, A.; BANAIGS, B.; ABOU-MANSOUR, E.; BURGESS, J. WRITGHT, P. Marine cianobactérias-a prolific source of natural products. **Tetrahedron**. n. 590, p. 9347-9377, 2001.
- CABALLERO-CÓRDOBA, G. B. **Levedura de cervejaria: composição, valor protéico e avaliação de toxicidade subcrônica em células íntegras, células mecanicamente rompidas e concentrado protéico**. Campinas, 1997. 164p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Universidade Federal de Campinas.
- CABALLERO-CÓRDOBA, G. M.; SGARBIERI, V. C. Nutritional and toxicological avaliation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and yeast protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 80, n. 3, p. 341-351, 2000.
- CAMPELLO, C. C., CARVALHO, V. L.; VIEIRA, K. M.; FARIAS, D. F.; BRASIL, I. C. F.; MAIA, A. A. B.; MORAIS, J. K. S.; CARVALHO, A. F. U.; VASCONCELOS, I. M. Desempenho e parâmetros séricos de ratos alimentados com dietas contendo soja integral crua. **Braz J Vet Anim Sci**, v. 46, n. 3, p. 188-198, 2009.
- CARVAJAL, J. C. L. **Caracterização e modificações químicas da proteína da microalga *Spirulina (Spirulina maxima)***. João Pessoa, 2009. 138p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Federal da Paraíba.
- CARVALHO, L. **Desenvolvimento de Novos Alimentos para Praticantes de Atividade Física Adicionados ou não de *Spirulina***. Rio Grande, 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande.
- CHAUD, S. G.; SGARBIERI, V. C.; VICENTE, E. Influence of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cell wall fractions on some nutritional parameters of growing rats. **Rev. Nutr.**, v. 21, n. 2, p. 137-147, 2008.
- CHRONAKIS, I.S. Gelation of edible blue-green algae protein isolate (*Spirulina platensis* strain pacifica): thermal transitions, rheological properties, and molecular forces involved. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 888-898, 2001.

- CIFERRI, O. *Spirulina*, the edible microorganism. **Microbiol. Rev.** v. 47, n. 55, p. 1-578, 1983.
- COHEN, Z. **The chemicals of *Spirulina***. In: VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira) physiology, cell-biology and biotechnology*. London: Taylor & Francis, 1997. 233 p.
- COLLA, L. M. **Influência das condições de crescimento sobre o potencial antioxidantes da microalga *S. platensis* e seu potencial na redução da hipercolesterolemia**. Rio Grande, 2002. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande.
- COLLA, L. M.; MUCCILLO-BAISCH A. L.; COSTA, J. A. V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. **Braz Arch Biol Technol.** v. 51, n. 2, p. 405-411, 2008.
- COMAR, S. R.; DANCHURA, H. S. M.; SILVA, P. H. Platelet count: evaluation of manual methodologies and application in the laboratory routine. **Rev Bras de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 6, 2009.
- DEMAN, J. M. **Principles of Food chemistry**. Westport: The AVI Publishing Company, Inc. p. 35-85, 1981.
- DENARDIN, C. C.; BOUFLEUR, N.; RECKZIEGEL, P.; SILVA, L. P. Influência do consumo de arroz ou de macarrão no desempenho e resposta metabólica em ratos. **Alimentos e Nutrição**. v. 20, n. 3, p. 441-449, 2009.
- DERNER, R. B. **Efeito de fontes de carbono no crescimento e na composição bioquímica das microalgas *Chaetoceros muellei* e *Thalassiosira fluviatilis*, com ênfase no teor de ácidos graxos poliinsaturados**. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.
- DEVLIN, T. M. *Textbook of biochemistry – with clinical correlations*. São Paulo: Edgard Blucher, 2007. 1186p.
- DUARTE, S. M. da S.; ABREU, C. M. P. de; MENEZES, H. C.; PAULA, F. B. de A.; PEREIRA, R. G. F. A.; GOUVEA, C. M. C. P. Peeled coffee brew effect in the antioxidant activity hematological and biochemical parameters in rats. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v. 29, n. 4, p. 703-708, 2009.
- FDA - Food and Drug Administration (2003). Disponível em: <http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings/ucm153674.htm>. Acesso: outubro de 2010.

- FELDMAN, B. F.; ZINKL, I. G.; JAIN, N. C. **Schalm's – Veterinary Hematology**. 5ª Edição. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 1344p.
- FÉVRIER, C.; SÉVE, B. Essais d'incorporation de spiruline (*Spirulina maxima*) dans les aliments des porcins. **Ann. Nutr. Aim.** v. 29, p. 625-650, 1976.
- FERREIRA-PINTO, G. e ARAUJO-NETO, J. S. Limits for single cell protein utilization in human feeding. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. v. 22, n. 1, p. 49-63, 1972.
- GUARIENTI, C. **Potencial antioxidante da microalga *Spirulina* frente a condições de estresse oxidativo**. Rio Grande, 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande.
- GUYTON, A. C. **Tratado de fisiologia médica**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Interamericana Ltda, 1984. 926p.
- HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **Biology and clinical of rabbits and rodents**. 3ª Edição. São Paulo, Roca, 1993. 238p.
- HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina*: superalimento del future**. 2ª Edição. Barcelona: Editora Urano S.A, 1994. 222p.
- JASSBY, A. ***Spirulina*: a model for microalgae as human food**. In: Algae and human affairs. Cambridge: Cambridge University Press, 1988. 179p.
- JOOD, S.; SINGH, M. Amino acid composition and biological evaluation of the protein quality of high lysine barley genotypes. *Plant Food for Human Nutrition*, 2001.
- KAPPOR, S. J.; MEHTA, U. Iron Status and growth of rats fed different dietary iron sources. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 44, n. 1, p.29-34, 1993.
- KIHLBERG, R. The microbe as a source of food. **Annual Review of Microbiology**. v. 26., n. 4, p. 426-465, 1972.
- KRISHNAKUMARI, M. K. Food safety evaluation: Acute oral and dermal effects of the algae *Scenedesmus acutus* and *Spirulina platensis* on albino rats. **J. Food Protect.** v. 44, p. 934-935, 1981.
- KUHAD, R. C.; SINGH, A.; TRIPATHI, K. K.; SAXENA, R. K. Microorganisms as an alternative source of protein. **Nutrition Reviews**. V. 55, p. 65–75, 1997.
- LEB-FURG. Laboratório de Engenharia Bioquímica da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande. Disponível em: [http://www.leb.furg.br/proj\\_spiru.htm](http://www.leb.furg.br/proj_spiru.htm). Acesso em: outubro de 2010.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2ª Edição. São Paulo: SARVIER, 2006. 839 p.

- LEMOS, M. R. B. **Estudo comparativo de três farelos de arroz. Respostas biológicas e nutricionais, testadas em ratos *Wistar***. Rio Grande, 1999. 112p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande.
- MARCO, P. L. **Avaliação da biodisponibilidade de nutrientes em multimisturas acrescidas de *Spirulina platensis***. 2008. 84f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande do Sul.
- MELO, D. S. de; CORRÊA, A. D.; MARCOS, F. C. A.; SOUSA, R. V.; ABREU, C. M. P. de; SANTOS, C. D. Effects of cassava leaves flour on the AST, ALT, ALP enzymes activity and hepatic lipids of *Wistar* rats. **Ciênc. Technol. Aliment.**, v. 28, p. 32-37, 2008.
- MILLER, D. S.; BENDER, A. E. The determination of the net protein utilization of proteins by a hortened method. **British Journal of Nutrition**, v. 9, 382–388, 1955.
- MILLER O. **Laboratório para o clínico**. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Atheneu, 1993. 493p.
- MILLS, E. N. C.; ALCOCER, M. J. C.; MORGAN, M.R.A. Biochemical interaction of food derived peptides. **Trends in Food Science and Technology**. v. 3, n. 3, p. 64-68, 1992.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id\\_area=124&CO\\_NOTICIA=11662](http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/default.cfm?pg=dspDetalheNoticia&id_area=124&CO_NOTICIA=11662) Acesso em: outubro de 2010.
- MITCHELL, G. V.; GRUNDEL, E.; JENKINS, M.; BLAKELY, S. R. Effects of graded dietary levels of *Spirulina maxima* on vitamins A and E in male rats. **J Nutr.**, v. 120, p. 1235-1240, 1990.
- MITRUKA, M. B.; RAWNSLEY, H. M. **Clinical, biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans**. 2ª Edição. New York: Masson Publishing, 1981. 314p.
- MIRANDA, M. S.; CINTRA, R. G.; BARROS, S. B. M.; FILHO, J. M. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V. 31, p. 1075-1079, 1998.
- MOLINA, G. E.; BELARBI, E. H.; ACIÉN-FERNANDEZ, F. G. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process option and economics. **Biotechnology Advances** v. 20, p. 491–515, 2002.



- MORAIS, M. G. **Fixação de dióxido de carbono e produção de ácidos graxos por microalgas**. Rio Grande, 2006. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande.
- MORAIS, M. G.; REICHERT, C. C.; DALCANTON, F.; DURANTE, A. J.; MARINS, L. F. F.; COSTA, J. A. V. Isolation and characterization of a new *Arthrospira* strain. **Z. Naturforsch.** v. 63, p.144–150, 2008.
- MORAIS, M. G.; RADMANN, E. M.; ANDRADE, M. R.; TEIXEIRA, G. G.; BRUSCH, L. R. F.; COSTA, J. A. V. Pilot scale semi continuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. **Aquaculture**, v. 294, p. 60–64, 2009.
- MORTON, D. B.; ABBOT, D.; BARCLAY, R.; CLOSE, B. S.; EWBANK, R.; GASK, D.; HEATH, M.; MATTIC, S.; POOLE, T.; SEAMER, J.; SOUTHEE, J.; THOMPSON, A.; TRUSSEL, B.; WEST, C.; JENNINGS, M. Removal of blood from laboratory mammals and birds. **Laboratory Animals**, v. 27, p. 1-22, 1993.
- MULITERNO, Adriana Et al. Cultivo Mixotrófico da Microalga *Spirulina platensis* em Batelada Alimentada. **Ciência Agrotecnológica**, v. 29, n. 6, p. 1132-1138, 2005.
- NAGAOKA, S.; SHIMIZU, K.; KANEKO, H.; SHIBAYAMA, F.; MORIKAWA, K.; KANAMARU, Y.; OTSUKA, A.; HIRAHASHI, T.; KATO, T. A novel protein Cphycocyanin plays a crucial role in the hypocholesterolemic action of *Spirulina platensis* concentrate in rats: **Journal of Nutrition**, v. 135, p. 2425-2430, 2005.
- ORI, M.; SEGURO, C. A.; ROCHA, A. S. Efeito inibidor do soro de ratos com insuficiência renal aguda e crônica sobre a atividade fagocitária “in vitro”. **Revista Inst. Med.** v. 32, p. 409-413, 1990.
- PAG (PROTEIN ADVISORY GROUP) PAG ad hoc working group on clinica evaluation and accetable nucleic acid of SPC for human consuption protein-calorie Advisory Group of the United Nations System. **Protein-Caloire Advisory Group Bulletin**, New York, v. 3, p. 17-23, 1975.
- PELIZER, L. H.; DANESI, E. D. G.; RANGEL, C. O. Influence of inoculum age and concentration in *Spirulina platensis* cultivation. **J. Food Eng.** v. 56, p. 371–375, 2003.
- PHANG, S. M. *Spirulina* culture in digested sago starch factory waste water. **J. Appl. Phycol.** V. 12, p. 395-400, 2000.
- QUEVEDO, H. J. M.; QUINTANA, L. B.; MANRIQUE, C. E. M.; FARNÉS, O. C. Aspectos bioquímicos de La recuperación de ratones Balb/C malnutridos com um

- hidrolizado protéico de *Chlorella vulgaris*. **Rev. Cubana Aliment. Nutri.**, v. 16, n. 1, p. 5-12, 2002.
- RADMANN, E. M.; COSTA, J. A. V. Conteúdo lipídico e composição de ácidos graxos de microalgas expostas aos gases CO<sub>2</sub>, SO e NO<sub>2</sub>. **Revista Química Nova**. Vol. 31, n. 7, p. 1609-1612, 2008.
- RAMÍREZ, L. Uso tradicional y actual de *Spirulina* sp. (*Arthrospira* sp.). **INCI**, v.31, n.9, p.657-663, 2006.
- RANGEL, C. **Influência da luz e da uréia no crescimento e conteúdo de clorofila da biomassa de *Spirulina platensis***, 2000. São Paulo (Dissertação de mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, São Paulo.
- REDDY, M. C.; SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S. V. K.; BHAT, V. B.; REDDY, P. S.; KIRANMAI, G.; MADYASTHA, K.M.; REDDANNA, P. C-phycocyanin, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis in lipopolysaccharide- stimulated RAW 264.7 macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 304, p. 385-392, 2003.
- REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. AIN-93 Purified Diets for Laboratory Rodents: Final Report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76 Rodent Diet. **Rodent Diet**, v. 123, n. 6, p.1939-1951, 1993.
- RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture**. CRC Press, Boston, 1990.
- RODRIGUES, P. B. Aminoácidos Digestíveis Verdadeiros da Soja e Subprodutos, Determinados com Galos Cecectomizados. **R. Bras. Zootec.**, 31, n. 2, p.970-981, 2002.
- RODRIGUES, E.R; MORETI, D. L. C.; MARTINS, C. H. G.; KASAI, A.; STOPPA, M. A.; ALVES, E. G.; PAZ, K.; LOPES, R. A.; SALA, M. A.; PETENUSCI, S. O. Estudos dos parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**.v. 8, n. 4, p. 169-172, 2006.
- ROGATTO, G. P.; OLIVEIRA, C. A. M. de; SANTOS, J. W. dos; MACHADO, F. de B.; NAKAMURA, F. Y.; MORAES, C. de; ZAGATTO, A. de M.; FARIA, M. C.; AFONSO, M.; MELLO, M. A. R. de. Influência da ingestão de *Spirulina* sobre o metabolismo de ratos exercitados. **Rev. Bras. Med. Esportiva**, v. 10, n. 4, 2004.
- ROSA, A. P. C.; CARVALHO, L. F.; GOLDBECK, L. **Fixação de gás carbônico por microalgas e obtenção de biomassa para alimentação de animais aquáticos.**

- Rio Grande, 2005. 20p. Projeto de conclusão de curso (Engenharia de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande (FURG).
- ROZENFELD, P.; DOCENA, G. H.; AÑON, M. C.; FOSSATI, C. A. Detection and identification of a soy protein component that cross-reacts with caseins from cow's milk. **Clin. Exp. Immunol.** v. 130, p. 49-58, 2002.
- SANCHEZ, M.; BERNAL-CASTILLO, J.; ROZO, C.; RODRIGUEZ, I. *Spirulina (Arthrospira): An Edible Microorganism. A Review.* **Revista Universitas Scientiarum.** V. 8., 2003.
- SANCHIS, F. S.; SILBIGER, H. L. N. **Animais de Laboratório – PURINA.** São Paulo: Purina Alimentos Ltda., 1986. 21p.
- SANTOS, H. B., MADRUGA, M. S., BION, F. M. Studies in rat: biochemical and hematological on bioavailability of minerals in diet enriched with "multimixture". **Science and Technology of Food.** v. 24, n. 4, p. 613-618, 2004.
- SGARBIERI, V. C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradação, modificação.** São Paulo, Ed. Varela, 1996. 517p.
- SILVA, M. H. L. **Desenvolvimento e caracterização de um isolado protéico de soja modificado com perfil de solubilidade da caseína do leite humano.** Viçosa, 2001. 128p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais.
- SILVA, P. V. **Leite caprino: caracterização físico-química, perfil de ácidos graxos e avaliação biológica (ratos fêmeas *Wistar*).** Pelotas, 2009. 156p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.
- SHIMAMATSU, H. Mas production of *Spirulina* edible microalga. **Hydrobiol.** v. 512, p. 39-44, 2004.
- SHONS, P. F.; LEITE, A. V.; NOVELLO, D.; BERNARDI, D. M.; MORATO, P. N.; ROCHA, L. M.; REIS, S. M. P. M.; MIYASAKA, C. K. Protein efficiency of lentil (*Lens culinares*) in development of *Wistar* rat. **Food and Nutrition**, v. 20, n. 2, p. 255-260, 2009.
- SOUZA-SOARES, L. A.; MACHADO, M. R. G.; RODRIGUES, R. da S. **Experimentação com animais de laboratório: manual básico.** Pelotas, Ed. Universitária – UFPel, 2009. 468p.
- STATISTICA, Statsoft. (*data analysis software system*), version 7 for *Windows*. [www.statsoft.com](http://www.statsoft.com).2004.

- TOMASELLI, L.; GIOVANNETTI, L.; TORZILLO, G. – Physiology of stress response in *Spirulina* spp. In: DOUMENGE, F.; DURAND- CHASTEL, H. & TOULEMONT, A. (eds). **Spiruline Algue de Vie**. Bulletin de L'Institut Océanographique, Monaco, n.12, p. 65-75, 1993.
- VAN DER MEER, W.; MACKENZIE, M. A.; DINNISSEN, J. W. Pseudoplatelets: a retrospective study of their incidence and interference with platelet counting. **J Clin Pathol.**, v. **56**, n. 10, p.772-774, 2003.
- VAZ, J. S.; DEBONI, F.; AZEVEDO, J.; GROSS, J. L.; ZELMANOVITZ, T. Fatty acids as biological markers of fat intake. **Revista de Nutrição**. V. 19, n. 4, p. 489-500, 2006.
- VIEIRA, R. L. ; BION, F. M. Valor biológico de dieta à base de soja (Glycine hispide) e algaroba (Prosopis juliflora). **B. Ceppa**. v. 16, n. 1, p. 85-98, 1998.
- VILELA, E. S. D. ; SGARBIERI, V. C. Determination of protein value of integral cells, total autolysate and yeast extract (*Saccharomyces* sp.). **Rev. Nutr.**, v. 13, n. 3, p. 185-192, 2000a.
- VILELA, E. S. D. ; SGARBIERI, V. C. Determination of protein value of integral cells, total autolysate and yeast extract (*Saccharomyces* sp.). **Rev. Nutr.**, v. 13, n. 3, p. 185-192, 2000b.
- VILELA, E. S. D. ; SGARBIERI, V. C. ; ALVIM, I. D. Nutritive value of biomass of integral cells, autolysate and extract and yeast cells from beer. **Rev. Nutr.**, v. 16, p. 127-134, 2000.
- VON DER WEID, D.; DILLON, J. C.; FALQUET, J. **Malnutrition: a silent massacre**, 1ª Edição. Geneve: Antenna Technology, 2000.
- WHO – World Health Organization. (2010). Disponível em: <http://www.who.int/en>  
Acesso em: outubro de 2010.
- YOSHINO, Y.; HIRAI, Y. ; TAKAHASHI, H. ; YAMAMOTO, N. ; YAMAZAKI, N. The chronic intoxication test on *Spirulina* product fed to *Wistar*-strain rats. **Jap. J. Nutr.** v. 3, n. 8, p.1-225, 1980.
- ZARROUK, C. **Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima***. Paris, 1996. 103f. Tese (PhD), Universidade de Paris.
- ZEPKA, L. Q. **Avaliação bioquímica e nutricional da *Aphanothece* microscópica *Nügelii* cultivada no efluente da parboilização do arroz**. Rio Grande, 2008. 98p.

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande.

ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GOLDBECK, R.; SOUZA-SOARES, L. A.; QUEIROZ, M. I. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica* Nägeli. **Bioresource Technology**. (publicação à frente da versão impressa), 2010.

## **APÊNDICE**

**APÊNCIDE 1 – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO  
ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL**

**DE PELOTAS, RS – BRASIL**



Pelotas, 21 de dezembro de 2009.

**De:** Prof. Dr. Orlando Antonio Lucca Filho  
Pres. da Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEE A)

**Para:** Profª. Rosane da Silva Rodrigues  
Departamento de Ciência dos Alimentos  
Faculdade de Ciências Domésticas

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto de pesquisa intitulado: “**Avaliação da resposta tecidual de ratos alimentados com diferentes extratos protéicos advindos da produção de biomassas microalgais**”, processo nº 23110. 008077/2009-22 sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste Projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa para posterior registro no COCEPE (Código para Cadastro nº CEEA 8077).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Orlando Antonio Lucca Filho  
Presidente da CEEA