



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA MICROALGA *Spirulina* FRENTE A CONDIÇÕES DE
ESTRESSE OXIDATIVO**

ENG^a. CÍNTIA GUARIENTI

PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
ORIENTADOR

PROF^a. DR^a. TELMA ELITA BERTOLIN
CO-ORIENTADORA

Rio Grande, RS

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA MICROALGA *Spirulina* FRENTE A CONDIÇÕES DE
ESTRESSE OXIDATIVO**

Eng^a. CÍNTIA GUARIENTI

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

PROF. DR. JORGE ALBERTO VIEIRA COSTA
ORIENTADOR

PROF^a. DR^a. TELMA ELITA BERTOLIN
CO-ORIENTADORA

Rio Grande, RS
2009

“De nada adianta querer apressar as coisas; tudo vem ao seu tempo, dentro do prazo que lhe foi previsto. Temos pressa em tudo, aí acontecem os atropelos do destino, aquela situação que você mesmo provoca por pura ansiedade de não aguardar o tempo certo”.

Paulo Coelho

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Jorge Alberto Vieira Costa e à minha co-orientadora professora Telma Elita Bertolin, pelas diretrizes seguras, orientação, apoio, confiança e incentivo. Além da minha gratidão, admiro-os por seu caráter e sabedoria;

Aos meus pais e minha irmã pelo constante apoio e compreensão, e pelo incentivo para o aperfeiçoamento do meu conhecimento;

Ao meu noivo, Lessandro, pela compreensão, pelo apoio, pela companhia nos dias e horários mais inusitados de ida à universidade e pelo auxílio nos momentos mais difíceis;

Às amigas e companheiras de bancada: Dilmara, Vanessa e Andressa, pelo auxílio durante várias etapas deste trabalho; agradeço-as pela amizade e pelos conhecimentos partilhados;

Aos amigos do laboratório de Fermentações da UPF, em especial a Gabriela e Daiane, pelo enorme esforço e dedicação nas pesquisas desenvolvidas;

Aos funcionários da secretaria e dos laboratórios de Fisiologia e Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da UPF, Milton, Dona Ledi, Franciele e Sirlei que colaboraram e apoiaram este trabalho, profissional e pessoalmente;

À Universidade Federal do Rio Grande (FURG) e Universidade de Passo Fundo (UPF) por tornarem este trabalho possível;

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência e Alimentos (PPGEA) pela formação proporcionada;

À CAPES pelo apoio à pesquisa e pela bolsa de estudos concedida;

À todos que, direta ou indiretamente, colaboraram na execução deste trabalho.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	2
RESUMO	3
ABSTRACT.....	4
1.1 INTRODUÇÃO.....	5
1.2 OBJETIVOS.....	7
1.2.1 Objetivo Geral.....	7
1.2.2 Objetivos Específicos.....	7
1.3 JUSTIFICATIVA.....	8
 CAPÍTULO II.....	 11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	12
2.1.1 Definições.....	12
2.1.2 Legislação.....	14
2.2 MICROALGA <i>Spirulina</i>	17
2.2.1 Proteínas e aminoácidos.....	18
2.2.2 Ácidos graxos essenciais.....	19
2.2.3 Pigmentos.....	19
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO	20
2.4 ESPÉCIES REATIVAS	21
2.5 LIPOPEROXIDAÇÃO.....	23
2.6 DANO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC).....	24
2.7 SUBSTÂNCIAS PROMOTORAS DE ESPÉCIES REATIVAS	25
2.7.1 Monoglutamato de sódio.....	25
2.7.2 Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio)	27
2.8 DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	28
2.8.1 Antioxidantes Não-enzimáticos	29
2.8.2 Defesas Antioxidantes Enzimáticas	31
2.8.2.1 Superóxido Dismutase	31
2.8.2.2 Catalase.....	32
2.9 MODELOS BIOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE ..	32
2.9.1 Ratos	32
2.9.2 Leveduras.....	33
 CAPÍTULO III.....	 35
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 TIPO DE PESQUISA	36
3.2 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA SPIRULINA EM LEVEDURAS <i>Saccharomyces</i> <i>Cerevisiae</i>	36
3.2.1 Antioxidante	36
3.2.2 Agente estressor.....	36
3.2.3 Cultivos e tratamentos	36
3.2.4 Sobrevivência celular	37
3.2.5 Sustâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA)	37
3.2.6 Análise Estatística.....	37
3.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA SPIRULINA EM RATOS FRENTE A PARÂMETROS DE ESTRESSE QUÍMICO.....	38

3.3.1 Grupos experimentais	38
3.3.2 Soluções administradas	38
3.3.3 Período de tratamento e procedimentos de administração das soluções	38
3.3.4 Eutanásia	39
3.3.5 Preparação do tecido e análises	39
3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SPIRULINA EM RATOS FRENTE A PARÂMETROS DE ESTRESSE FÍSICO	40
3.4.1 Grupos experimentais	40
3.4.2 Soluções administradas	40
3.4.3 Período de tratamento e procedimentos de administração das soluções	41
3.4.4 Eutanásia	41
3.4.5 Preparação do tecido e análises	41
3.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA FICOCIANINA EM RATOS FRENTE A PARÂMETROS DE ESTRESSE QUÍMICO	42
3.5.1 Grupos experimentais	42
3.5.2 Soluções administradas	43
3.5.3 Período de tratamento e procedimentos de administração das soluções	43
3.5.4 Eutanásia	43
3.5.5 Preparação do tecido e análises	44
 CAPÍTULO IV	 45
 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA MICROALGA <i>Spirulina platensis</i> EM CÉLULAS DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSOR PARAQUAT .	 46
 USO DA MICROALGA <i>Spirulina</i> NA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS	 61
 EFEITO NEUROPROTETOR DA FICOCIANINA EM RATOS	 85
 CAPÍTULO V	 97
5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
5.2 CONCLUSÃO GERAL	99
 CAPÍTULO VI	 100
 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 101

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	12
Figura 1 Microalga <i>Spirulina platensis</i>	18
Figura 2 Desbalanço entre antioxidantes e pró-oxidantes.....	21
Figura 3 Peroxidação de lipídeos pela reação de radicais livres	24
Figura 4 Glutamato livre em alimentos.....	25
Figura 5 Distribuição do glutamato livre no organismo humano	26
Figura 6 Formação de radicai slivres aumentada via paraquat com consequente lipoperoxidação e dano tecidual.....	28
Figura 7 Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
CAPÍTULO III.....	45
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA MICROALGA <i>Spirulina platensis</i> EM CÉLULAS DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSOR PARAQUAT .	46
Figura 1 Aumento do percentual de sobrevivência da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> tratada com <i>Spirulina</i> em presença de paraquat.....	55

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO III.....	45
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA MICROALGA <i>Spirulina platensis</i> EM CÉLULAS DA LEVEDURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SUBMETIDAS AO ESTRESSOR PARAQUAT .	46
Tabela 1 Sobrevivência celular para os diferentes tratamentos das células da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	55
Tabela 2 Índice de TBA da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para os tratamentos com paraquat em presença e ausência de <i>Spirulina</i>	55
USO DA MICROALGA <i>Spirulina</i> NA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS.....	61
Tabela 1 Índice de TBA do córtex de ratos tratados com monoglutamato de sódio e <i>Spirulina</i>	68
Tabela 2 Valores das enzimas superóxido dismutase e catalase em córtex de ratos tratados com monoglutamato e <i>Spirulina</i>	69
Tabela 3 Índice de TBA do córtex de ratos submetidos ao pânico e a administração de <i>Spirulina</i>	71
Tabela 4 Valores da enzima superóxido dismutase em córtex de ratos submetidos a estresse oxidativo e com administração de <i>Spirulina</i>	72
Tabela 5 Valores da enzima catalase em córtex de ratos submetidos a estresse nervoso e com administração de <i>Spirulina</i>	72
EFEITO NEUROPROTETOR DA FICOCIANINA EM RATOS	85
Tabela 1 Índice de TBA do córtex de ratos submetidos a administração de ficocianina e monoglutamato de sódio.....	90
Tabela 2 Valores das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em córtex de ratos tratados com monoglutamato de sódio e ficocianina	91

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada em seis capítulos. O Capítulo I apresenta a Introdução Geral, contendo Resumo, Abstract, Introdução, Objetivos, Justificativa e Histórico.

No Capítulo II está descrita a Revisão Bibliográfica e no Capítulo III Material e Métodos.

Os resultados estão apresentados sob forma de três artigos científicos no item Desenvolvimento do Trabalho, Capítulo IV. As seções Material e Métodos, Resultados e Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios artigos.

O Capítulo V apresenta o item Conclusão Geral, com interpretações e comentários gerais sobre os artigos científicos. O item Referências Bibliográficas, Capítulo VI, refere-se às citações que aparecem nos Capítulos I, II, III e V.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO GERAL

RESUMO

As propriedades nutricionais da microalga *Spirulina* têm sido relacionadas com possíveis propriedades antioxidantes, caracterizando-a no âmbito dos alimentos funcionais. Os antioxidantes são compostos que atuam inibindo e/ou diminuindo efeitos desencadeados pelo estresse oxidativo, conservando a harmonia entre a produção fisiológica de radicais livres e sua detoxificação. Objetivou-se avaliar o potencial antioxidante da microalga *Spirulina* e seu principal pigmento, a ficocianina, em situações de estresse oxidativo induzido. Foram realizados estudos com células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, submetidas a estresse oxidativo pela adição de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo (paraquat) nas concentrações 0, 10 e 15 mM, avaliando o potencial antioxidante da *Spirulina* através da sobrevivência celular (plaqueamento) e da lipoperoxidação (índice de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, TBA). Também foi avaliado o efeito protetor da *Spirulina* e/ou da ficocianina em córtex cerebral de ratos submetidos a estresse oxidativo por administração de glutamato monossódico ou por situação de pânico. No córtex dos animais foram avaliados os índices de TBA e a atividade específica das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). O uso do herbicida paraquat nas concentrações 10 mM e 15 mM, diminuiu a sobrevivência celular da levedura em relação ao controle (39,4 % e 17,1 %, respectivamente) e aumentou significativamente a lipoperoxidação ($p \leq 0,05$). O agente estressor glutamato monossódico provocou aumento significativo ($p \leq 0,05$) da lipoperoxidação e diminuição significativa ($p \leq 0,05$) das atividades específicas das enzimas SOD e CAT no córtex cerebral dos ratos. O estresse por situação de pânico também provocou alterações significativas ($p \leq 0,05$) no córtex dos ratos, aumentando a peroxidação lipídica e a atividade da enzima SOD e diminuindo a atividade da enzima CAT. O uso da *Spirulina*, bem como da ficocianina, atenuaram os efeitos deletérios decorrentes do estresse oxidativo induzido em células de leveduras e em córtex de ratos, mantendo os parâmetros dos grupos tratados com estressor e antioxidante estatisticamente iguais aos do grupo controle. Estes resultados contribuem com a caracterização da microalga no âmbito dos alimentos funcionais antioxidantes.

Palavras chave: antioxidante, radicais livres, *Spirulina*

ABSTRACT

The nutritional properties of the microalgae *Spirulina* have been related with possible therapeutical properties, characterizing it in the scope of functional and nutraceutical foods mainly had its antioxidant potential. The antioxidant substances are composites that act inhibiting and/or decreasing the effect unchained of oxidative stress, conserving the balance between physiological production of free radicals and its detoxification. It was objectified to evaluate the antioxidant potential of the microalgae *Spirulina* and its main pigment, the phycocyanin, in situation of oxidative stress induced. studies whit cells of *Saccharomyces cerevisiae* yeast had been carried, submitted oxidative stress for the addition of 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo (paraquat) in concentrations 0, 10 and 15 mM, evaluating the antioxidant potential of the *Spirulina* through the cellular survival and reactivates substances index to the tiobarbituric acid (TBA). Also was evaluated the protective effect of the *Spirulina* and phycocyanin, in cerebral cortex of rats submitted to oxidative stress induced for glutamate monosodic administration or panic situation. In the cortex of animals the TBA index, and activity of enzymes superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) had been evaluated. The use of paraquat in concentrations 10 mM and 15 mM, decreased yeast cellular survival in relation to the control (39.4% and 17.1%, respectively) and increased the lipoperoxidation significantly ($p \leq 0,05$). The estressor agent glutamate monossodic provoked significant increase ($p \leq 0,05$) in lipoperoxidation and significant reduction ($p \leq 0,05$) of enzymes SOD and CAT in the cerebral cortex of the rats. The oxidative stress for panic situation also provoked significant alterations ($p \leq 0,05$) in the cortex of the rats, increasing the lipidic peroxidation and the activity of enzyme SOD and diminishing the activity of enzyme CAT. The use of the *Spirulina*, as well as phycocyanin, had attenuated the decurrent deleterious effect of oxidative stress induced in cells of yeast and in cortex of rats, keeping the parameters of the groups dealt with statistical equal stressor and antioxidant substance to the ones of the group has controlled. These results contribute with the characterization of the microalgae in the scope of antioxidant functional foods.

Key words: antioxidant, free radicals, *Spirulina*

1.1 INTRODUÇÃO

O potencial biotecnológico das microalgas tem sido muito focado, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos. A imensa biodiversidade e conseqüente variabilidade na composição bioquímica da biomassa obtida das culturas microalgais, aliadas ao emprego de melhoramento genético e ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala, vêm permitindo que determinadas espécies sejam comercialmente utilizadas. Nesse sentido, cultivos de microalgas têm sido realizados visando à produção de biomassa tanto para uso na elaboração de alimentos quanto para a obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial. Dentre os inúmeros compostos extraídos, ou com potencial de exploração comercial, podem ser relacionados ácidos graxos poliinsaturados, carotenóides, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e diversos compostos bioativos naturais (antioxidantes, redutores do colesterol, etc.), os quais podem ser empregados especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais, por suas propriedades nutricionais e farmacêuticas.

As pesquisas em biotecnologia alimentar empregando microalgas vêm ganhando especial atenção; no entanto, a coleta e o cultivo para utilização na alimentação humana são realizados há séculos (RICHMOND, 1988). Segundo o mesmo autor, povos nativos do Chade, na África, e do lago Texcoco (Astecas), no México, alimentavam-se de produtos feitos com biomassa de *Spirulina* spp. Bory, (Cyanophyceae) e, ainda hoje, os nativos do Chade, em determinadas épocas do ano, dependem quase que exclusivamente da coleta desta microalga para sua alimentação (JOURDAN, 1996).

A microalga *Spirulina* é legalmente autorizada como complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos pelo FDA (Food and Drug Administration), sem efeitos tóxicos ao organismo (VON DER WEID *et al.*, 2000; BELAY *et al.*, 1993). No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) permite sua comercialização desde que o produto final no qual a microalga tenha sido adicionada esteja devidamente registrado (BRASIL, 2008). Certas características da *Spirulina* sugerem aplicações clínicas, sendo que muitos testes revelaram os efeitos terapêuticos dessa microalga em pacientes acometidos de diversas doenças (RICHMOND, 1990).

O controle do nível das enzimas antioxidantes nas células é extremamente importante para a sobrevivência no ambiente aeróbico (BARNETT e KING, 1995). Os organismos eucariotos possuem enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase, a

catalase e a glutathione peroxidase que reagem com os compostos oxidantes e protegem as células e os tecidos do estresse oxidativo (TRABER, 1997). Em adição aos efeitos protetores dos antioxidantes endógenos, a inclusão de antioxidantes na dieta é de grande importância e o consumo de frutas e vegetais está relacionado com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (POMPELLA, 1997). Os estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado, principalmente, o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Entretanto, nos alimentos são encontrados uma grande variedade de substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (HERCBERG *et al.*, 1998; JACOB, 1995; NIKI *et al.*, 1995).

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial antioxidante da microalga *Spirulina* sob condições de estresse oxidativo *in vivo*.

1.2.2 Objetivos Específicos

Verificar o poder antioxidante da microalga *Spirulina* em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas a estresse oxidativo induzido pelo produto químico 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo (paraquat);

Avaliar o potencial antioxidante da microalga *Spirulina* em ratos frente à condição de estresse oxidativo induzido com monoglutamato de sódio;

Estudar o efeito antioxidante da microalga *Spirulina* em ratos submetidos a estresse oxidativo gerado por situação de pânico;

Analisar a capacidade antioxidante do pigmento ficocianina, proveniente da microalga *Spirulina*, em ratos tratados com monoglutamato de sódio como promotor de estresse oxidativo.

1.3 JUSTIFICATIVA

A promoção da saúde com qualidade de vida e a busca por uma alimentação saudável têm sido metas a serem alcançadas neste século. Reunir informações sobre o valor nutritivo dos alimentos e o efeito de seus nutrientes no organismo é um desafio. O assunto alimentos funcionais é atual, polêmico, mas indiscutivelmente inserido na agenda e no cenário daqueles que estudam e atuam no campo da ciência de alimentos.

A microalga *Spirulina* é uma fonte rica em diversos nutrientes, como proteínas, minerais, vitaminas, aminoácidos essenciais e ácidos graxos polinsaturados. Uma das provas mais contundentes da qualidade nutricional da *Spirulina* é a que se têm observado em populações que tradicionalmente consomem *Spirulina*, como os Kanembous, no Chad; e anotações históricas do consumo e qualidade de vida dos Astecas, no México. Quando da comparação com comunidades vizinhas que não consomem a microalga, o resultado é muito diferente relativo aos níveis nutricionais e de saúde geral.

A *Spirulina*, além de suas propriedades nutricionais básicas, tem apresentado propriedades terapêuticas, como a capacidade antioxidante, caracterizando a microalga no âmbito dos alimentos funcionais. Estudos recentes realizados no Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG demonstraram que a *Spirulina* é rica em ficocianina, seu principal pigmento, devendo esta ser uma das causas do seu efeito terapêutico.

Desde 1998, a ANVISA passou a elaborar regulamentações técnicas para análise de novos alimentos e ingredientes, incluindo aqueles com propriedades funcionais ou de saúde. Nestas regulamentações técnicas foram incluídas diretrizes para avaliação de risco e para comprovação de propriedade funcional ou de saúde. Para dar subsídios a essas novas diretrizes da ANVISA, formou-se a Comissão Técnico-Científica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos (CTCAF), que vêm trabalhando para avaliar as comprovações científicas quanto à segurança de uso de novos alimentos ou ingredientes; avaliar pedidos de registro, e analisar a eficácia das alegações de função e ou de saúde propostas.

Seguindo a linha de pesquisa implantada no Laboratório de Engenharia Bioquímica e continuando os estudos envolvendo as propriedades funcionais da *Spirulina* faz-se necessária uma avaliação mais detalhada do potencial antioxidante que essa microalga possui. Justifica-se a realização deste estudo no intuito de corroborar com a alegação de propriedade funcional antioxidante da *Spirulina*, através do uso de diferentes modelos biológicos. A ampliação de evidências científicas que comprovem a atuação da

Spirulina como antioxidante, incrementam o material necessário para o reconhecimento da mesma como alimento funcional junto a ANVISA.

1.4 HISTÓRICO

Desde 1996 o Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG pesquisa o cultivo de microalgas em trabalhos de iniciação científica, trabalhos de conclusão de curso, dissertações de mestrado e teses de doutorado. Foram estudados cultivos descontínuos e semicontínuos, cultivos em fotobiorreatores abertos e fechados, o efeito de fatores como temperatura, iluminância, aeração, taxa de renovação, concentração de corte, o perfil em ácidos graxos na microalga, fontes de nutrientes alternativas, como a água da Lagoa Mangueira, os custos de produção, o potencial hipocolesterolêmico da *Spirulina platensis*, o isolamento de uma cepa nativa de *Spirulina* da Lagoa Mangueira, a modelagem matemática do crescimento de *Spirulina* e a formulação de produtos alimentícios adicionados de biomassa da microalga, como massas, sopas instantâneas, bebida isotônica, bolo de chocolate e cereal em barra entre outros.

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, 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*. Atualmente esta unidade produz cerca de 50 kg de *Spirulina* mensais que deverão ser, em breve, adicionados à merenda escolar na região. Outros projetos estão em andamento, em parceria com a ELETROBRÁS (Centrais Elétricas Brasileiras S.A.) e a CGTEE (Companhia de Geração Térmica de Energia Elétrica), visando a utilização de microalgas para a fixação de CO₂ originado na combustão de carvão para a geração de energia elétrica; e com a PETROBRÁS, para a produção de biodiesel de microalgas.

O Laboratório de Engenharia Bioquímica está comprometido com diversos projetos relacionados a *Spirulina*, dentre eles pode-se citar o Projeto Petrobrás Fome Zero – Fontes protéicas: Produção de alimentos como alternativa para segurança alimentar e geração de trabalho e renda na metade sul do Rio Grande do Sul. O primeiro tem por

objetivo oferecer possibilidades para o desenvolvimento sustentável e segurança alimentar para populações carentes da metade sul do RS, o segundo tem por objetivo a implantação de um centro de referência em tecnologias apropriadas ao desenvolvimento sustentável, a produção de biomassa para a merenda escolar e a disseminação da produção da microalga.

Diversos estudos foram desenvolvidos no Laboratório de Engenharia Bioquímica relacionados ao cultivo da microalga na metade sul do Rio Grande do Sul dentre eles cita-se: Duarte *et al.* (2003) que estudaram o cultivo da *Spirulina platensis* usando a água da Lagoa Mangueira, Reinehr (2003) estudou o cultivo semicontínuo da microalga *spirulina platensis* utilizando água da lagoa mangueira. Carvalho (2005) estudou a utilização de recursos hidrobiológicos de alta alcalinidade do sul do estado na aquicultura de produção de microalgas. Andrade *et al.* (2005) estudaram os cultivos autotrófico e mixotrófico de *spirulina platensis* em diferentes escalas e condições ambientais no sul do Brasil. Em relação aos fatores nutricionais, terapêuticos e de possíveis usos da *Spirulina* na alimentação podem-se destacar os seguintes trabalhos: Cavalett *et al.* (2002) desenvolveram a formulação de bebida isotônica e de pudim de chocolate utilizando *Spirulina platensis*; Bianchini *et al.* (2001) desenvolveram a formulação de outros produtos alimentícios utilizando *Spirulina platensis*. Colla *et al.* (2002) avaliaram a influência das condições de crescimento sobre o potencial antioxidante da microalga *Spirulina platensis* e seu potencial na redução da hipercolesterolemia. Radmann *et al.* (2005) estudaram a produção de lipídios de microalgas e Calheiros (2004) estudou a extração de lipídios a partir de microalgas. Morais e Costa (2006) estudaram a fixação de dióxido de carbono e a produção de ácidos graxos por microalgas.

CAPÍTULO II

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

2.1.1 Definições

Um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo pode afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença (ROBERFROID, 2002). Os alimentos funcionais são alimentos que provêm a oportunidade de combinar produtos comestíveis de alta flexibilidade com moléculas biologicamente ativas, como estratégia para consistentemente corrigir distúrbios metabólicos (WALZEM, 2004), resultando em redução dos riscos de doenças e manutenção da saúde (ANJO,2004).

Os alimentos funcionais se caracterizam por oferecer vários benefícios à saúde, além do valor nutritivo inerente à sua composição química, podendo desempenhar um papel potencialmente benéfico na redução do risco de doenças crônicas degenerativas (TAIPINA *et al.*, 2002; NEUMANN *et al.*, 2000).

Os alimentos e ingredientes funcionais podem ser classificados de dois modos: quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando em seis áreas do organismo: no sistema gastrointestinal; no sistema cardiovascular; no metabolismo de substratos; no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular; no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (SOUZA *et al.*, 2003).

Uma grande variedade de produtos tem sido caracterizada como alimentos funcionais, incluindo componentes que podem afetar inúmeras funções corpóreas, relevantes tanto para o estado de bem-estar e saúde como para a redução do risco de doenças. Esta classe de compostos merece uma categoria própria, que não inclua suplementos alimentares, mas o seu papel em relação às doenças estará, na maioria dos casos, concentrado mais na redução dos riscos do que na prevenção.

Os alimentos funcionais apresentam as seguintes características:

- a) devem ser alimentos convencionais e serem consumidos na dieta normal/usual;
- b) devem ser compostos por componentes naturais, algumas vezes, em elevada concentração ou presentes em alimentos que normalmente não os supririam;

- c) devem ter efeitos positivos além do valor básico nutritivo, que pode aumentar o bem-estar e a saúde e/ou reduzir o risco de ocorrência de doenças, promovendo benefícios à saúde além de aumentar a qualidade de vida, incluindo os desempenhos físico, psicológico e comportamental;
- d) a alegação da propriedade funcional deve ter embasamento científico;
- e) pode ser um alimento natural ou um alimento no qual um componente tenha sido removido;
- g) pode ser um alimento onde a natureza de um ou mais componentes tenha sido modificada;
- h) pode ser um alimento no qual a bioatividade de um ou mais componentes tenha sido modificada (ROBERFROID, 2002).

Por sua vez, o nutracêutico é um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença. Tais produtos podem abranger desde os nutrientes isolados, suplementos dietéticos na forma de cápsulas e dietas até os produtos benéficamente projetados, produtos herbais e alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas (ROBERFROID, 2002; HUNGENHOLTZ, 2002; ANDLAUER e FÜRST, 2002; KWAK e JUKES, 2001). Vários nutracêuticos podem ser produzidos através de métodos fermentativos com o uso de microrganismos considerados como GRAS (Generally Recognized as Safe). Os nutracêuticos podem ser classificados como fibras dietéticas, ácidos graxos poliinsaturados, proteínas, peptídios, aminoácidos ou cetoácidos, minerais, vitaminas antioxidantes e outros antioxidantes (glutaciona, selênio) (ANDLAUER e FÜRST, 2002).

O alvo dos nutracêuticos é significativamente diferente dos alimentos funcionais, por várias razões:

- a) enquanto que a prevenção e o tratamento de doenças (apelo médico) são relevantes aos nutracêuticos, apenas a redução do risco da doença, e não a prevenção e tratamento da doença estão envolvidos com os alimentos funcionais;
- b) enquanto que os nutracêuticos incluem suplementos dietéticos e outros tipos de alimentos, os alimentos funcionais devem estar na forma de um alimento comum (KWAK e JUKES, 2001).

Kruger e Mann (2003) definem os ingredientes funcionais como um grupo de compostos que apresentam benefícios à saúde, tais como as alicinas presentes no alho, os carotenóides e flavonóides encontrados em frutas e vegetais, os glucosinolatos

encontrados nos vegetais crucíferos os ácidos graxos poliinsaturados presentes em óleos vegetais e óleo de peixe. Estes ingredientes podem ser consumidos juntamente com os alimentos dos quais são provenientes, sendo estes alimentos considerados alimentos funcionais, ou individualmente, como nutracêuticos. Devem ter adequado perfil de segurança, demonstrando a segurança para o consumo humano. Não devem apresentar risco de toxicidade ou efeitos adversos de drogas medicinais (BAGCHI *et al.*, 2004).

2.1.2 Legislação

O termo “alimentos funcionais” foi primeiramente introduzido no Japão em meados dos anos 80 e se refere aos alimentos processados, contendo ingredientes que auxiliam funções específicas do corpo além de serem nutritivos, sendo estes alimentos definidos como “Alimentos para uso específico de saúde” (*Foods for Specified Health Use-FOSHU*) em 1991. Estabelece-se que FOSHU são aqueles alimentos que têm efeito específico sobre a saúde devido a sua constituição química e que não devem expor ao risco de saúde ou higiênico.

No Reino Unido, o Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentos (MAFF) define alimentos funcionais como “um alimento cujo componente incorporado oferece benefício fisiológico e não apenas nutricional”. Esta definição ajuda distinguir alimentos funcionais de alimentos fortificados com vitaminas e minerais.

Nos Estados Unidos da América do Norte os termos alimentos funcionais e nutracêuticos têm sido usados conforme a definição estabelecida. No entanto, a dificuldade se encontra na regulamentação destes termos, pois deve haver uma diferenciação entre produtos que são vendidos e consumidos como alimentos (funcionais) e aqueles que um componente, em particular, foi isolado e é vendido na forma de barras, cápsulas, pós, entre outros (nutracêuticos). A separação desses produtos é necessária quando se estabelece limites de consumo (PIMENTEL *et al.*, 2005).

O Comitê de Alimentos e Nutrição do Instituto de Medicina da FNB (Federação Náutica de Brasília) define alimentos funcionais como qualquer alimento ou ingrediente que possa proporcionar um benefício à saúde, além dos nutrientes tradicionais que eles contêm (HASLER, 1998).

O escritório Americano de Contas Gerais (*US General Accounting Office-GAO*) define alimentos funcionais como alimentos que se declaram ter benefícios além da nutrição básica. A FDA (*Food and Drug Administration*) regula os alimentos funcionais

baseada no uso que se pretende dar ao produto, na descrição presente nos rótulos ou nos ingredientes do produto. A partir destes critérios, a FDA classificou os alimentos funcionais em cinco categorias: alimento, suplementos alimentares, alimento para usos dietéticos especiais, alimento-medicamento ou droga (NOONAN e NOONAN, 2004).

O alimento é definido como artigos usados para comer e beber por homens ou outros animais e goma de mascar, assim como os artigos usados para compor qualquer artigo do tipo. Um alimento é algo que possa ser consumido pelo seu gosto, aroma ou valor nutritivo. A FDA define valor nutritivo como aquele que sustenta a existência humana de tal maneira que promova crescimento, substituição de nutrição essencial perdida, ou proveja energia (NOONAN e NOONAN, 2004). Para o Codex Alimentarius, alimento é definido como sendo qualquer substância, quer seja processada, semi-processada ou crua, destinada ao consumo humano, incluindo bebidas, goma de mascar e qualquer substância que seja usada na fabricação, preparação ou tratamento do alimento. Porém, não inclui cosméticos, tabaco ou substâncias usadas apenas como drogas (SOUZA *et al.*, 2003).

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou os Alimentos Funcionais e Novos Alimentos através das Resoluções ANVISA/MS 16/99; ANVISA/MS 17/99; ANVISA/MS 18/99 e ANVISA/MS 19/99.

- Resolução ANVISA/MS 16/99 trata de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes, cuja característica é não necessitar de um Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) para registrar um alimento, além de permitir o registro de novos produtos sem histórico de consumo no país e também novas formas de comercialização para produtos já consumidos (BRASIL, 1999 a).

- Resolução ANVISA/MS 17/99 estabelece as diretrizes básicas para a Avaliação de Riscos e Segurança de Alimentos que prova, baseado em estudos e evidências científicas, se o produto é seguro sob o ponto de vista de risco à saúde ou não (BRASIL, 1999 b).

- Resolução ANVISA/MS 18/99 aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análises e comprovação de propriedades funcionais e/ou de saúde, alegadas em rotulagem de alimentos (BRASIL, 1999c).

- Resolução ANVISA/MS 19/99 aprova o regulamento técnico de procedimento para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem (BRASIL, 1999d).

Essas resoluções fazem distinção entre alegação de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde, como segue:

- **Alegação de propriedade funcional:** é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que uma substância (nutriente ou não) tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano.
- **Alegação de propriedade de saúde:** é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de relação entre o alimento ou ingrediente com doenças ou condições relacionadas à saúde. Não são permitidas alegações de saúde que façam referência à cura ou prevenção de doenças.

As Resoluções ANVISA/MS nº 18, e ANVISA/MS nº 19, descrevem as Diretrizes para Utilização da Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde:

- A alegação de propriedade funcional e ou de saúde é permitida em caráter opcional.
- O alimento ou ingrediente que alegar propriedade funcional ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se trata de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica.
- São permitidas alegações de função e ou conteúdo para nutrientes e não nutrientes no crescimento, desenvolvimento e funções normais do organismo, mediante demonstração da eficácia. Para os nutrientes com funções plenamente reconhecidas pela comunidade científica não será necessária a demonstração de eficácia ou análise da mesma para alegação funcional na rotulagem (item 3.3 da Resolução ANVISA/MS nº 18).
- No caso de uma nova propriedade funcional, há a necessidade de comprovação científica da alegação de propriedade funcional e da segurança de uso, segundo as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos.
- As alegações podem fazer referências à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos nutrientes e não nutrientes à redução de risco a doenças (BRASIL, 1999c; BRASIL, 1999d).

Para ser registrado como alimento funcional deve ser comprovada a alegação de propriedade funcional com base em:

- Consumo previsto ou recomendado pelo fabricante;
- Finalidade, condições de uso e valor nutricional, quando for o caso;
- Evidências científicas: composição química com caracterização molecular e ou formulação do produto; ensaios bioquímicos; ensaios nutricionais e ou fisiológicos e ou

toxicológicos em animais de experimentação; estudos epidemiológicos; ensaios clínicos; evidências abrangentes da literatura científica, organismos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecida sobre as propriedades e características do produto e comprovação de uso tradicional, observado na população, sem associação de danos à saúde (PIMENTEL *et al.*, 2005; BRASIL, 1999d; BRASIL, 1999c).

2.2 MICROALGA *Spirulina*

Spirulina é uma microalga filamentosa que habita meios diversos como solos, areias, pântanos, lagos alcalinos e águas salobras, marinhas e doces. Por meio da fotossíntese, converte os nutrientes em matéria celular e libera oxigênio. Os nutrientes de que necessita são água e fonte de carbono, nitrogênio, fósforo, potássio, ferro e outros oligoelementos. Em lagos naturais o aporte delimitado de nutrientes pode regular os ciclos de crescimento, sendo que a densidade celular cresce rapidamente, alcança uma concentração máxima e retrocede quando os nutrientes se esgotam. A liberação de nutrientes por parte das células mortas ou o aporte de nutrientes de fora do lago iniciam um novo ciclo (HENRIKSON, 1994).

Os primeiros relatos do uso da *Spirulina* na alimentação datam da pré-história, a partir da informação de que tribos de caçadores coletavam massas gelatinosas de algas verde-azuladas e as consumiam cruas ou cozidas. Para enriquecer suas dietas, também consumiam algas filamentosas coletadas em lagos alcalinos, as quais são conhecidas como sendo do gênero *Spirulina* (RICHMOND, 1990). As microalgas têm recebido atenção especial devido a seu conteúdo, por exemplo, ácidos graxos polinsaturado, β -caroteno e outros pigmentos (antioxidantes) e polissacarídeos fosfatados (anti-virais) e esteróis (antimicrobianos).

A *Spirulina* apresenta elevado conteúdo protéico e é considerada uma das fontes mais ricas de pró-vitamina A (beta-caroteno) e de ferro absorvível, além de apresentar altos níveis de vitaminas e outros minerais, compostos fenólicos, ficocianina, ácido gama-linolênico e outros ácidos graxos essenciais (VON DER WEID *et al.*, 2000; BELAY *et al.*, 1993).

As vitaminas que podem estar presentes na *Spirulina* são a biotina, o ácido fólico, o inositol, as vitaminas B12, B6, B3, B2, B1 e E, além do ácido pantotênico. A quantidade de vitamina E presente na microalga é de aproximadamente 190mg/kg de *Spirulina*. (HENRIKSON, 1995; RICHMOND, 1990). Segundo a Dietary Reference Intake (DRI,

2000), a recomendação diária permitida de vitamina E (tocoferol) para homens e mulheres saudáveis é de 15mg/d. Sendo assim, faz-se necessário ingerir cerca de 80mg/d de *Spirulina* para suprir a necessidade de vitamina E requerida por um adulto saudável. Os minerais presentes na *Spirulina* são: o cálcio, o fósforo, o magnésio, o ferro, o zinco, o cobre, o cromo, o manganês, o sódio e o potássio, sendo que os principais são o cálcio (1,3 a 1,4g/kg de *Spirulina*), o fósforo (6,7 a 9,0g/kg de *Spirulina*) e o potássio (6,4 a 15,4g/kg de *Spirulina*) (HENRIKSON, 1994).

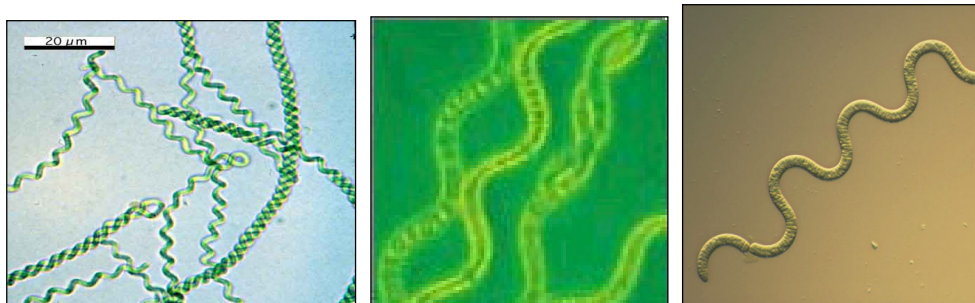


Figura 1 Microalga *Spirulina platensis*

Fonte: (<<http://images.google.com.br>>)

Entre os constituintes da microalga *Spirulina* destacam-se as proteínas de alta qualidade, os ácidos graxos polinsaturados e os pigmentos antioxidantes.

2.2.1 Proteínas e aminoácidos

As proteínas e aminoácidos são os responsáveis estruturais. A microalga *Spirulina* apresenta entre 60 a 70 % de proteínas na sua composição, comparando-se com outras fontes de proteínas, apresenta teores mais elevados que a carne de peixe (15-20 %), que sementes de soja (35 %), ovos (12 %), cereais (8-14 %) e leite integral (3 %). Quanto aos aminoácidos, na *Spirulina* os limitantes são a cisteína e a metionina, porém, apresentam-se nesta alga em quantidades superiores às encontradas em cereais, sementes e verduras (HENRIKSON, 1994).

Quanto a digestibilidade, devido a parede celular formada por mucopolissacarídeos brandos, apresenta facilidade de digestão pelo organismo humano, sendo que cerca de 85-95 % são digeridos.

2.2.2 Ácidos graxos essenciais

Inúmeros trabalhos relatam a presença de ácidos graxos polinsaturados na microalga *Spirulina*, indicando esta microalga como uma fonte potencial do ácido gama-linolênico (GLA), o qual constitui cerca de 20-25 % dos lipídios da microalga (ALONSO e MAROTO, 2000).

Os ácidos graxos essenciais, importantes sob o ponto de vista nutricional, não são sintetizados no organismo humano pela ausência das dessaturases específicas responsáveis pela formação das duplas ligações nestes compostos, devendo ser introduzidos através da dieta. Os ácidos graxos reconhecidos pela WHO/FAO como essenciais são o linoléico, α -linolênico, γ -linolênico e araquidônico (ALONSO e MAROTO, 2000). O ácido γ -linolênico, apesar de ser sintetizado a partir do ácido linoléico, é considerado como essencial por existirem evidências da perda desta capacidade com o envelhecimento. O ácido araquidônico é sintetizado a partir da dessaturação do ácido γ -linolênico. As principais fontes de ácidos graxos insaturados são os óleos vegetais, entre os quais se citam os óleos de milho, açafrão, soja, girassol e canola, além de óleos de peixes, microalgas e fungos.

A essencialidade destes ácidos graxos está relacionada ao fato de serem os precursores das prostaglandinas, substâncias semelhantes aos hormônios, as quais controlam numerosas funções. As prostaglandinas PGE1 intervêm na regulação da tensão arterial, na síntese de colesterol, inflamações e crescimento celular. No organismo, também podem ser sintetizados a partir do ácido linolênico da dieta, transformando-se em GLA e posteriormente em PGE1 (RICHMOND, 1990).

2.2.3 Pigmentos

Entre os pigmentos que compõe a *Spirulina*, verifica-se a presença dos carotenóides, da ficocianina e da clorofila.

l) Carotenóides: os carotenóides são fotopigmentos lipossolúveis podendo apresentar-se como β -caroteno, xantofilas, zeaxantina e luteína. As quantidades de β -caroteno encontradas na microalga podem chegar a concentrações dez vezes maior que as encontradas na cenoura. Em 10 g da microalga seca, pode encontrar cerca de 23.000 UI (14 mg) do composto, cerca de 460 % da dieta recomendada. Em valores percentuais, o conteúdo de carotenóides é de 0,37 % na microalga (HENRIKSON, 1994).

O consumo de β -caroteno tem sido indicado por reduzir os riscos de contração de câncer, devido à capacidade de desativar os radicais livres, evitando que reacionem no organismo. Também podem estimular populações de lactobacilos intestinais, aumentando a absorção de vitamina B1. Devido esta característica a microalga tem sido utilizada em tratamentos da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), já que um dos efeitos da doença é a incapacidade do intestino de absorver minerais, o que pode desencadear o desenvolvimento de infecções (HENRIKSON, 1994).

II) Ficocianina: a ficocianina é o principal pigmento da microalga, podendo chegar a 20 % em peso seco. Tem sido utilizada como pigmento alimentício e de cosméticos. Seu uso inclui coloração de doces, sorvetes, produtos lácteos e bebidas não alcoólicas (RICHMOND, 1990).

A ficocianina apresenta-se como estimulante ao sistema imunológico, aumentando a contagem de leucócitos, cuja função principal é manter a saúde dos órgãos do corpo, proteger contra o câncer, úlceras e hemorróides (HENRIKSON, 1994). A atividade antioxidante de extratos obtidos na purificação da ficocianina foi demonstrada por Estrada *et al.* (2001).

III) Clorofila: a clorofila pode ser utilizada como corante alimentício verde. É encontrada em pequenas quantidades na microalga quando comparada às quantidades de ficocianina, sendo de apenas 1,1 %, apresentando-se principalmente como clorofila-a (HENRIKSON, 1994).

Estas substâncias presentes na microalga são apresentadas como participantes na atenuação dos danos celulares provenientes do desequilíbrio entre a formação de radicais livres e espécies reativas e as defesas antioxidante, ou seja, o estresse oxidativo.

2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

Em organismos aeróbios saudáveis, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) está balanceada com as defesas antioxidantes. O balanço não é perfeito, e pode ocorrer dano em moléculas, que podem ou não ser reparadas (DNA) ou substituídas (oxidação de proteínas). O estresse oxidativo é resultado da diminuição de defesas antioxidantes ou aumento na produção de espécies ativas, pela exposição a valores excessivos de O_2 ou de agentes intoxicantes. Portanto o estresse oxidativo é um distúrbio no balanço entre pro-oxidantes e antioxidantes (Figura 2), em favor do primeiro, gerando um dano em potencial. Tal dano é chamado de estresse oxidativo (HALLIWELL, 1996).



Figura 2 Desbalanço entre antioxidantes e pró-oxidantes

O estresse oxidativo pode resultar em adaptação ou lesão celular. Na adaptação, as células podem tolerar o estresse oxidativo, por meio de autoregulação da síntese de defesas antioxidantes até restabelecer o equilíbrio. A lesão é o resultado de estímulos químicos ou fisiológicos, que alteram transitoriamente ou permanentemente a homeostase da célula. A resposta à lesão pode ser reversível ou irreversível. As reversíveis são chamadas de adaptações celulares (HALLIWELL, 1996).

O estresse oxidativo pode causar dano em todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídios. O alvo principal do estresse oxidativo pode variar dependendo da célula, o tipo de exposição e a severidade do estresse (FRIDOVICH, 1998).

O comportamento de algumas células pode ser alterado em consequência do estresse oxidativo, afetando a comunicação intercelular, sendo que a excessiva geração de H_2O_2 promove a peroxidação de membranas, resultando na morte celular (SAGARA *et al.*, 1998).

2.4 ESPÉCIES REATIVAS

O Termo espécies reativas de oxigênio (ERO) refere-se aos radicais livres formados pela redução de oxigênio a aos não-radicais livres dele derivados, como o peróxido de hidrogênio, o oxigênio *singlet*, o ácido hipocloroso e o ozônio (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; HALLIWELL, 2006). Um radical livre é definido como qualquer espécie química capaz de ter existência independente e que contém um ou mais elétrons desemparelhados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; SOUTHORN e POWIS, 1998). Os radicais livres são formados em um cenário de oxirredução ou se, no rompimento de

uma ligação covalente, cada um dos átomos envolvidos ficar com um elétron (fissão homolítica) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, pelo menos 95 % do oxigênio molecular sofre redução tetravalente, resultando na geração de água. Durante esse processo, as espécies reativas superóxido, hidroperoxila, hidroxila e peróxido de hidrogênio são produzidas em pequenas quantidades na mitocôndria (cadeia respiratória) (COHEN, 1999). Outras fontes celulares de ERO são o retículo endoplasmático, a membrana nuclear, a membrana plasmática (lipoxigenase, prostaglandina sintetase) e algumas substâncias encontradas no citosol (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Além de ser formado durante a respiração celular, o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) pode ser produzido em reações de auto-oxidação e por certas enzimas, como a xantina oxidase (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; FRIDOVICH, 1998). Apesar de não causar, diretamente, danos ao DNA, proteínas e lipídios, a citotoxicidade do $O_2^{\bullet-}$ está relacionada a sua capacidade de gerar outras ERO.

O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pode ser formado pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ (FRIDOVICH, 1998) ou por outras reações (HALLIWELL, 2006; HALLIWELL, 2001). O H_2O_2 é pouco reativo e parece ser incapaz de oxidar o DNA, lipídios e proteínas, exceto aquelas proteínas que possuem grupos tiólicos hiper-reativos e resíduos de metionina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; BORUTAITE E BROWN, 2001; LEVINE *et al.*, 1999). Essa baixa reatividade do H_2O_2 pode ser vantajosa, se for considerado que ERO é gerada em processos inflamatórios e está presente no ar exalado, na urina e na maioria das bebidas quentes (café solúvel, por exemplo) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

O radical OH^{\bullet} reage com DNA, carboidratos, proteínas e lipídios, danificando-os. Assim, se o OH^{\bullet} for produzido próximo ao DNA, poderão ocorrer modificações em bases nitrogenadas e resíduos de açúcar, levando à inativação ou mutação do DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; HALLIWELL, 2001). Além disso, o OH^{\bullet} tanto compromete a atividade biológica das proteínas ao oxidá-las (DEAN *et al.*, 1997), quanto induz a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados das membranas celulares (lipoperoxidação) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; HALLIWELL, 2001). Os efeitos da lipoperoxidação sobre as membranas podem ser de quatro tipos:

- (1) mudanças no microambiente lipídico;
- (2) formação de novos canais de membrana, alterando a sua permeabilidade;
- (3) formação de ligações cruzadas entre proteínas e fosfolipídios, inativando-os irreversivelmente;

(4) oxidação de grupos sulfidrilas nos sítios ativos de enzimas ligadas à membrana, acarretando a perda de suas propriedades funcionais.

Dependendo da intensidade desses efeitos, a lipoperoxidação pode causar desde pequenas alterações na permeabilidade das membranas afetadas até a morte celular (MEERSON *et al.*, 1982).

2.5 LIPOPEROXIDAÇÃO

A lipoperoxidação (LPO) é um processo de oxidação de lipídios polinsaturados. Membranas e organelas celulares (mitocôndria, lisossomos e peroxissomos) contém grande quantidade de lipídios polinsaturados, os quais juntamente com as proteínas compõem os maiores constituintes biológicos de membranas (URSO e CLARKSON, 2003).

A peroxidação lipídica resulta em uma mistura complexa de hidroperóxidos e produtos secundários de oxidação, incluindo peróxidos cíclicos como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxi-2-trans-nonenal (HNE). (ANDREAZZA *et al.*, 2004; AKHGARI *et al.*, 2003; BANERJEE *et al.*, 1999). O MDA é importante na lipoperoxidação porque é utilizado através da reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA) na análise da lipoperoxidação *in vitro*, expresso em MDA equivalentes (nmol/mg proteína).

A LPO está relacionado com efeitos tóxicos de diversas substâncias químicas, injúrias nos tecidos e no desenvolvimento de doenças (DAL-PIZZOL *et al.*, 2000). As lipoproteínas também são alvos do dano oxidativo. A peroxidação de lipoproteínas de baixa densidade contribuem para a aterosclerose. As HDL são lipoproteínas de alta densidade, que removem o excesso de colesterol dos tecidos periféricos para o fígado, sendo considerado um agente que previne a aterosclerose. No entanto as HDL também podem sofrer lipoperoxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Há dados que a peroxidação na membrana de fígado e eritrócitos causam a formação de agregados de proteína com alto peso molecular na membrana, ocasionando deformações nos eritrócitos (AKHGARI *et al.*, 2003). Os receptores moleculares de resposta hormonal e citocinas também podem ser inativadas durante a peroxidação de lipídios (GALLOWAY e HANDY, 2003).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, com o envolvimento de RL, onde L representa o lipídio na Figura 3. Esta reação inicia-se com o seqüestro do hidrogênio do ácido graxo polinsaturado (LH) da membrana celular pelo OH· ou pelo LO·, formando o

radical $L\cdot$ (radical lipídico). Na fase de propagação, o $L\cdot$ reage com o O_2 resultando no radical $LOO\cdot$, que seqüestra um novo hidrogênio do ácido graxo polinsaturado, formando novamente o $L\cdot$. A fase de término ocorre quando os radicais $LOO\cdot$ e $L\cdot$ propagam-se até que sejam eliminados (ZWART *et al.*, 1999).

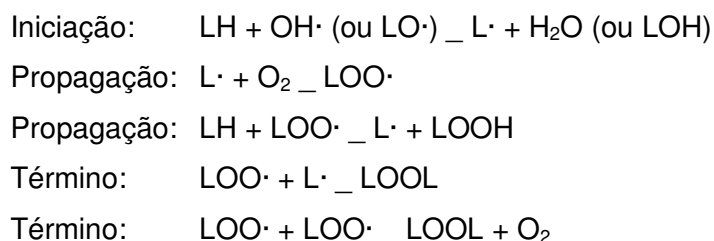


Figura 3 Peroxidação de lipídeos pela reação de radicais livres

Adaptado de ZWART *et al.*, 1999

2.6 DANO NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL (SNC)

Todos os organismos vivos podem sofrer com o dano oxidativo, no entanto o cérebro é o órgão mais sensível devido ao alto consumo de oxigênio e glicose. Também há grande consumo de energia, peroxidação de ácidos graxos, pequena produção de antioxidantes e rápida peroxidação das membranas do cérebro (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

O cérebro obtém quase toda sua energia a partir da fosforilação oxidativa mitocondrial, que produz ATP ao mesmo tempo que reduz o O_2 molecular a H_2O . Em determinadas condições, espécies altamente reativas, como os radicais livres de oxigênio e hidroxila, e o H_2O_2 podem ser gerados como produtos colaterais desse processo (GUPTA *et al.*, 2001). O excesso de ferro depositado no cérebro e alterações no metabolismo do ferro pode também contribuir no desenvolvimento de muitas doenças (DAL PIZZOL *et al.*, 2000).

Além disso, o metabolismo de alguns dos principais neurotransmissores, como a dopamina, gera ERO capazes de consumir as defesas antioxidantes, que são baixas em muitas regiões do cérebro (GILGUN-SHERKI *et al.*, 2002).

Estudos apontam que medicamentos também induzem ao dano oxidativo no cérebro de camundongos, como a apomorfina (MOREIRA *et al.*, 2004) e que o estresse oxidativo no sistema nervoso central (SNC) está relacionado com a patogênese de

doenças neurodegenerativas, tais como a esclerose múltipla (FLOYD e HENSLEY, 2002; KOUTSILIERI *et al.*, 2002).

2.7 SUBSTÂNCIAS PROMOTORAS DE ESPÉCIES REATIVAS

2.7.1 Monoglutamato de sódio

O monoglutamato de sódio ou glutamato monossódico (MSG) é o sal sódico do ácido glutâmico, um aminoácido presente em todas as proteínas animais e vegetais. Existem duas formas de glutamato. O glutamato existe na forma ligada como parte da proteína, junto com outros aminoácidos. Ele também pode ser encontrado na forma livre em tecidos de plantas e animais. É o glutamato livre que desempenha papel importante no sabor e na palatabilidade dos alimentos. Alimentos que contêm elevados teores de glutamato livre, tais como queijos e tomates maduros, são muitas vezes escolhidos pelos seus sabores distintos e agradáveis. A maior parte do glutamato proveniente da dieta é rapidamente metabolizado e usado como fonte de energia (GLUTAMATO E SABOR).

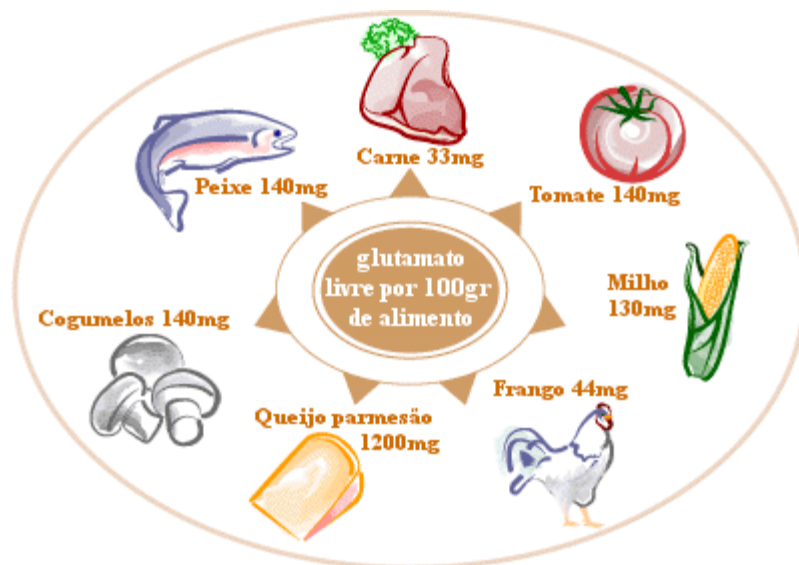


Figura 4 Glutamato livre em alimentos

Fonte: http://portuguese.glutamato.org/media/glutamato_e_sabor

O monoglutamato de sódio é uma substância bastante usada na indústria de alimentos para realçar o sabor dos alimentos, pois pode ser adicionado em carnes, peixes, frangos, vegetais e frutos do mar, sendo que em muitos países é usado como tempero de mesa. Do ponto de vista nutricional, o glutamato é um aminoácido não

essencial, o que significa que o nosso organismo, caso necessário, pode produzir seu próprio glutamato a partir de outras fontes protéicas. O nosso organismo produz seu próprio glutamato para uma variedade de funções essenciais. Uma pessoa consome em média entre 10 a 20 g de glutamato ligado e 1 g de glutamato livre a partir dos alimentos que ingere diariamente. Em adição, o corpo humano produz diariamente, cerca de 50 g de glutamato livre. O organismo humano contém aproximadamente 10 g de glutamato livre (GLUTAMATO E SABOR).

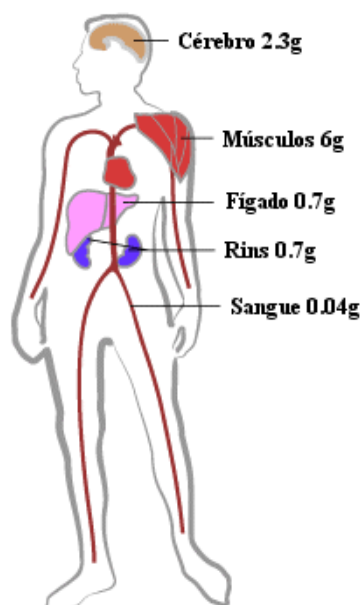


Figura 5 Distribuição do glutamato livre no organismo humano

Fonte: http://portuguese.glutamato.org/media/glutamato_e_sabor

No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), órgão do Ministério da Saúde responsável regulamentação, fiscalização e controle de aditivos e alimentos no país, através da Resolução ANVS / MS n° 386, de 05 de Agosto de 1999, publicada na Seção I do Diário Oficial da União do dia 9 de Agosto de 1999, classifica o realçador de sabor glutamato monossódico como um produto BPF (*quantum satis*), ou seja, com limite máximo de uso baseado na quantidade suficiente para se obter o efeito desejado no alimento.

O excesso de monoglutamato no cérebro permite demasiada afluência de cálcio para dentro da célula neuronal, propiciando a formação de radicais livres (RL) com morte celular (HENRIQUES *et al.*, 2001).

Farombi e Onyema (2006), demonstraram que a administração de monoglutamato de sódio via intraperitoneal na dose de 4 mg/ g de peso corpóreo, aumenta a formação de malonaldeído no fígado, rins e cérebro de ratos.

2.7.2 Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio)

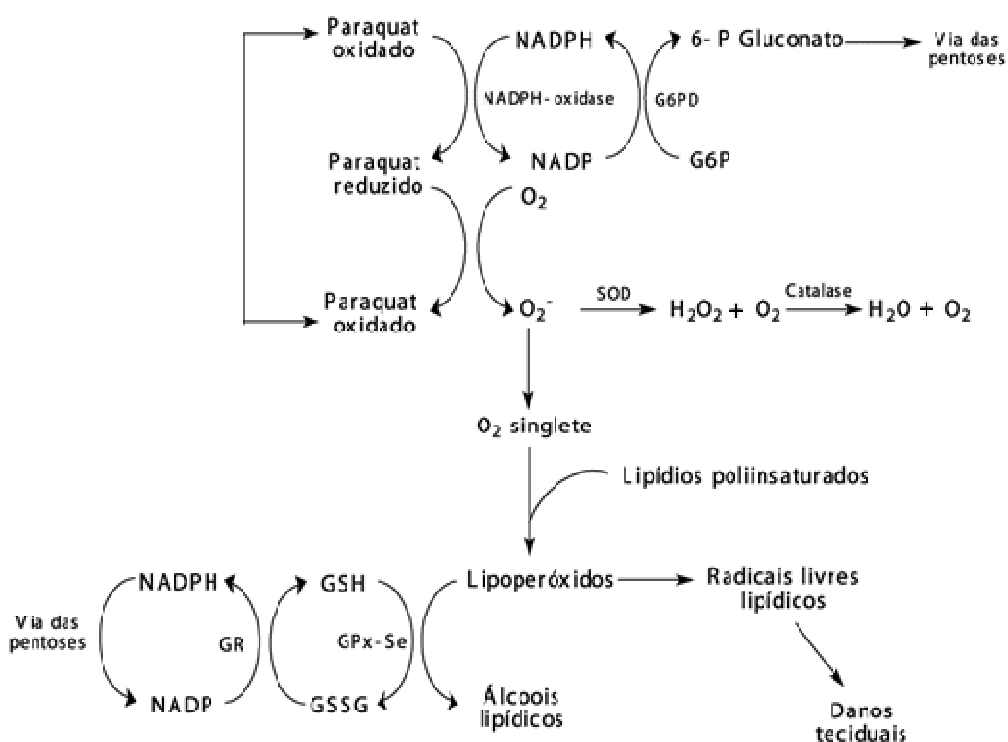
O paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio), um herbicida de contato não-seletivo, é amplamente utilizado em mais de cem países em culturas de fumo, algodão, arroz, café, cana-de-açúcar, feijão, maçã, soja e uva, entre outras (PETER *et al.*, 1992).

O mecanismo bioquímico responsável pela toxicidade do paraquat em mamíferos não está totalmente esclarecido (GIRI *et al.*, 1979). Entretanto, tem sido proposto que o dano tecidual deve-se ao aumento da formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, entre eles o radical superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot), os quais são instáveis e reagem rapidamente com ácidos graxos, provocando lesão nas membranas, proteínas e DNA (PETER *et al.*, 1992).

O mecanismo bioquímico de toxicidade do paraquat é representado na Figura 6. Inicialmente, ele reage com uma substância doadora de elétrons, o fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), sofrendo uma redução por ação da enzima NADPH-citocromo P_{450} redutase, o que resulta na geração de um radical paraquat (paraquat reduzido). Entretanto, sob condições aeróbicas, esse elétron é transferido ao oxigênio, que se transforma em ânion superóxido. Como há suprimento de oxigênio no tecido pulmonar, o radical paraquat rapidamente se auto-oxida, produzindo radicais superóxido e regenerando o paraquat (SMITH e HEATH, 1976; FARRINGTON *et al.*, 1973). Na presença de suprimento suficiente de equivalentes reduzidos (NADPH), podem ocorrer repetidos ciclos de redução e reoxidação do herbicida (PETER *et al.*, 1992).

O O_2^- que se forma pode ser detoxificado pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD), produzindo peróxido de hidrogênio. Esse produto formado é removido através da enzima catalase. Entretanto, a SOD pode ser suprimida pela grande quantidade de superóxido que vai sendo produzida quando há altas doses de paraquat. Dessa forma, os ânions superóxido sofrem uma reação de dismutação não-enzimática, formando o oxigênio singlete, que ataca os lipídios insaturados das membranas celulares, e dando origem a radicais livres lipídicos que, espontaneamente, geram radicais peróxil lipídicos. Esses podem reagir com outros ácidos graxos poliinsaturados, produzindo um hidroperóxido lipídico e mais radicais livres lipídicos, propagando o processo

continuamente como uma reação em cadeia chamada peroxidação lipídica (PETER *et al.*, 1992; BUS *et al.*, 1975). Em consequência o balanço entre a geração de radicais de oxigênio e sua dissipação pelos sistemas celulares de defesa (SOD, catalase, peroxidase, glutatona, vitamina E) é alterado, possibilitando que espécies reativas ataquem as biomoléculas, desencadeando o dano tecidual (PETER *et al.*, 1992).



G6P = glicose 6 fosfato ; G6PD = glicose 6 fosfato desidrogenase; GR = glutatona redurase;
GPx-Se = glutatona peroxidase + selênio; GSH = glutatona reduzida e GSSG = glutatona oxidada.

Figura 6 Formação de radicais livres aumentada via paraquat com consequente lipoperoxidação e dano tecidual

2.8 DEFESAS ANTIOXIDANTES

Os seres vivos dispõem de mecanismos protetores para retardar e/ou prevenir o acúmulo de espécies reativas e seus efeitos deletérios. Os sistemas de defesa podem ser

enzimáticos ou não. As principais enzimas que exercem esse papel são a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPX). Essas enzimas evitam o acúmulo de radical hidroxila, contra o qual não existe nenhum sistema enzimático de defesa. As defesas não-enzimáticas incluem antioxidantes lipofílicos (tocoferóis, carotenóides e bioflavonóides) e hidrofílicos (glutathione, ácido ascórbico, indóis e catecóis) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; FANG *et al.*, 2002).

2.8.1 Antioxidantes Não-enzimáticos

Do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos que contêm pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos ou naturais. Os antioxidantes sintéticos são largamente utilizados pela indústria de alimentos, sendo exemplos o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT). Os antioxidantes naturais podem ser substâncias bioativas como organosulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos (KITTS, 1994). Segundo a “Food and Drug Administration” (FDA), antioxidantes são substâncias usadas para preservar alimentos através do retardo da deterioração, rancidez e descolorações decorrentes da auto-oxidação (ADEGOKE, 1998). No entanto, como a ação dos antioxidantes não se restringe apenas à inibição da peroxidação dos lipídios, mas também da oxidação de outras moléculas, como proteínas, DNA, entre outras, de maneira mais ampla, pode-se definir antioxidante como substâncias que ao estarem presentes em pequenas concentrações, quando comparadas ao substrato oxidável, retardam ou previnem significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Os antioxidantes são, em sua maioria, compostos aromáticos que contêm pelo menos uma hidroxila. Compostos fenólicos (mono e poli) contendo um ou mais grupos de hidroxilas são utilizados como antioxidantes, que apresentam dois tipos principais: os complexantes e os bloqueadores de radicais, variando desde os solúveis em lipídios até os solúveis em água e dos naturais aos sintéticos. Os complexantes funcionam removendo os íons metálicos, reconhecidamente catalisadores da reação de lipídios. Os bloqueadores promovem a reação dos radicais livres formados no decorrer da oxidação, sendo a utilização conjunta destes geralmente sinérgica (ARAÚJO, 1995).

Os antioxidantes, segundo o mecanismo de ação, são classificados em antioxidantes primários e secundários. Os primeiros atuam interrompendo a cadeia da reação através da doação de elétrons ou hidrogênio aos radicais livres, convertendo-os

em produtos termodinamicamente estáveis e/ou reagindo com os radicais livres, formando o complexo lipídio-antioxidante que pode reagir com outro radical livre, a exemplo do butil-hidroxi-anisol, butil hidroxitolueno, ésteres do ácido gálico, butil hidroquinona, tocoferol e flavonóides (ADEGOKE, 1998). Os antioxidantes secundários atuam retardando a etapa de iniciação da auto-oxidação, por diferentes mecanismos que incluem complexação com metais; o seqüestro de oxigênio; a decomposição de hidroperóxidos para formar espécies não radicais; a absorção da radiação ultravioleta ou a desativação do oxigênio singlete. Os seqüestradores de oxigênio e quelantes de metais exibem efeito sinergista uma vez que atuam como doadores de hidrogênio para o radical fenoxil, regenerando o antioxidante primário, ou inativam íons metálicos, neutralizando seu efeito pró-oxidante. O efeito sinérgico pode ser observado entre antioxidantes primários e entre esses compostos não fenólicos, a exemplo do ácido ascórbico e lecitina (MOREIRA *et al.*, 2004).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: a dos com atividade enzimática e a dos sem essa atividade. Na primeira, estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda classe, estão moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Nesta classificação, incluem-se os antioxidantes naturais e sintéticos como os compostos fenólicos (MOREIRA *et al.*, 2004).

Os antioxidantes naturais e sintéticos têm sido recomendados para o alívio dos sinais e sintomas de determinadas doenças ou mesmo para o bloqueio de sua evolução. Apesar disso, há ainda muito a ser estudado, para que se determine o momento exato da utilização, a dose, a via de administração e o antioxidante ideal para cada caso. Portanto, o uso de medicamentos que contenham antioxidantes deve ser criterioso.

Inúmeros estudos têm demonstrado nos últimos anos uma alta correlação entre excesso de radicais livres e doenças crônico-degenerativas, o que levou a um grande interesse por elementos funcionais antioxidantes. Estes elementos são encontrados naturalmente em vários alimentos, em especial nas frutas, hortaliças, cogumelos comestíveis e até mesmo em alguns grãos. O Brasil possui uma riqueza muito grande de alimentos e preparações destacando-se, não só as matérias-primas pouco consumidas como algumas frutas da Amazônia e do Cerrado, mas também alimentos tradicionais pouco estudados como o feijão e o milho. Os elementos funcionais mais conhecidos como antioxidantes são os polifenóis, os carotenóides e a vitamina C. Muito tem sido estudado sobre a capacidade antioxidante das frutas e outros alimentos de clima temperado, porém pouco se conhece do potencial dos alimentos cultivados em solos brasileiros e

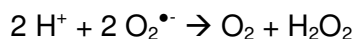
principalmente das espécies nativas (CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES DE ALIMENTOS VISANDO DETERMINAR O SEU POTENCIAL COMO ALIMENTO FUNCIONAL).

As células do nosso corpo estão constantemente sujeitas a danos tóxicos pela formação de radicais livres. Esses radicais livres são provenientes da oxidação da membrana celular, responsáveis pela ocorrência de diversas enfermidades e processos degenerativos do organismo humano. O termo antioxidante é utilizado para denominar a função de proteção celular contra os efeitos danosos dos radicais livres. Sendo que alguns nutrientes, naturalmente presentes ou adicionados nos alimentos, possuem propriedade antioxidante. São vários os nutrientes que têm essa ação no organismo. Entre eles estão as vitaminas C e E, carotenóides e isoflavona. A eficiência da função dos antioxidantes derivados da alimentação depende da sua biodisponibilidade e da ingestão de quantidades adequadas do nutriente. Entretanto, o consumo excessivo de algumas vitaminas antioxidantes pode causar hipervitaminose, que nada mais é do que uma quantidade exagerada de vitamina no organismo (SALGADO, 2007).

2.8.2 Defesas Antioxidantes Enzimáticas

2.8.2.1 Superóxido Dismutase

A superóxido dismutase (SOD) catalisa a reação de dismutação do radical superóxido até peróxido de hidrogênio e, conseqüentemente, diminui a formação das ERO e ERN dele derivadas, assim como qualquer dano direto por ele causado (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; FRIDOVICH, 1998).



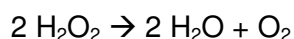
Existem duas formas de superóxido dismutase nas células eucarióticas: manganês-SOD (Mn-SOD) e a cobre-zinco-SOD (CuZn-SOD). A importância da Mn-SOD, presente na matriz mitocondrial (FRIDOVICH, 1998; WARD e PETERS, 1995), foi demonstrada em estudos onde camundongos geneticamente modificados não sintetizavam e morriam precocemente com danos mitocondriais severos (MELOV *et al.*, 1999; LEBOVITZ *et al.*, 1996; LI *et al.*, 1995). A CuZn-SOD está localizada no citosol, mas

também pode ser encontrada nos lisossomas, núcleo celular, espaço intermembrana da mitocôndria, peroxissoma fluido extracelular (FRIDOVICH, 1995; WARD E PETERS, 1995; ABRAHAMSSON *et al.*, 1992).

Embora a remoção do O_2^{\bullet} previna a formação de ERO, o H_2O_2 produzido pela SOD deve ser eliminado pelas enzimas catalase, glutathione peroxidase e também por outras peroxidases para impedi-lo de reagir com metais de transição e gerar o OH^{\bullet} (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; CADENAS E DAVIES, 2000).

2.8.2.2 Catalase

A catalase (CAT) é uma hemoproteína que acelera a decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (WARD e PETERS, 1995; CHANCE *et al.*, 1979).



A catalase é encontrada na maioria das células humanas, principalmente nos peroxissomas (CHANCE *et al.*, 1979). Alguns órgãos como o coração, o músculo esquelético e o cérebro, contêm menor quantidade e atividade de catalase que o fígado, o que os tornam mais vulneráveis à ação das ERO (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

2.9 MODELOS BIOLÓGICOS PARA AVALIAÇÃO DE CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

2.9.1 Ratos

O uso de animais como cobaias é antigo, vem desde o século XIX, quando os cientistas da época buscavam solucionar os problemas de saúde do homem. O primeiro experimento com animais foi feito em 1982 quando o DNA de um rato foi introduzido em um camundongo. Por mais de um século, os ratos têm sido as cobaias mais usadas pela ciência. O rato é escolhido para as diversas experiências por vários fatores, uma delas é pela sua fisiologia que é bem semelhante à fisiologia dos humanos, fazendo com que esses pequenos animais sejam perfeitos para estudar, entre outras doenças, a diabete, o mal de Alzheimer, a distrofia muscular e cânceres de todos os tipos (BIRCH, 2006). Segundo uma pesquisa feita por peritos do Instituto Allen de Ciência Cerebral, o sistema nervoso dos ratos aproxima-se extremamente do nosso com 99% de semelhança

(SGARBI, 2007). Além disso, o período de gestação dos ratos é de apenas 21 dias, muito curto, o que faz com que os resultados das experiências possam ser checados rapidamente. As fêmeas dão de três a seis ninhadas por ano, isso os torna extremamente vantajosos quando o desejo do cientista é testar o efeito dos medicamentos sobre os descendentes de quem irá consumi-los (COBAIAS DE LABORATÓRIO). Outra vantagem dos roedores é que eles não têm problemas com o incesto. Isso significa que gerações de irmãos e irmãs podem se reproduzir e criar animais com praticamente o mesmo DNA dos pais, o que faz com que os resultados dos experimentos possam ser reproduzidos. Além disso, os ratos são pequenos e chegam à fase adulta com rapidez. Do nascimento à morte, em média, são dois anos e meio (BIRCH, 2006).

2.9.2 Leveduras

A avaliação da capacidade antioxidante empregando animais de laboratório é, em geral, de difícil execução e necessita de um número elevado de animais para assegurar resultados estatisticamente significativos. Já os ensaios realizados com microorganismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas. Várias razões tornaram a levedura *Saccharomyces cerevisiae* um dos melhores modelos de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo. Seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias. Os ensaios em células eucarióticas permitem a avaliação da atividade antioxidante de inúmeros compostos de forma rápida, econômica e reprodutível e os resultados obtidos podem ser mais facilmente extrapolados para o homem, do que os obtidos em ensaios químicos (SOARES *et al.*, 2003; HENRIQUES *et al.*, 2001).

A avaliação da capacidade antioxidante pode ser feita pela medida da sobrevivência de células tratadas com os antioxidantes em presença e ausência de agentes estressores, como por exemplo, a apomorfina e o paraquat (SOARES *et al.*, 2003; ESPÍN *et al.*, 2000; BENZIE e SZETO, 1999; WANG *et al.*, 1999).

O fato de a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ser um dos microrganismos mais estudados do ponto de vista genético e metabólico, fez com que ela se tornasse um dos microrganismos mais utilizados em testes biológicos (HENRIQUES *et al.*, 2001). Desta

forma, testes em células eucarióticas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, assumem um importante papel na verificação da capacidade antioxidante de compostos naturais.

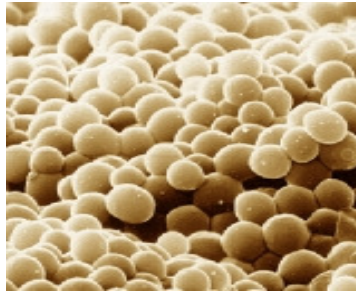


Figura 7 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

CAPÍTULO III
MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE PESQUISA

Pesquisa Quantitativa Experimental.

Entende-se por pesquisa quantitativa experimental, um estudo que pressupõe planejamento criterioso e rigoroso, onde situações são criadas e observadas através de técnicas específicas (PEDRON, 1999)

3.2 POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA SPIRULINA EM LEVEDURAS *Saccharomyces Cerevisiae*

3.2.1 Antioxidante

Foi analisado como composto antioxidante a microalga *Spirulina*, CEPA LEB-18, proveniente da Planta Piloto de Produção do Laboratório de Engenharia Bioquímica, localizada em Santa Vitória do Palmar. A quantidade de antioxidante utilizada foi de 0,025 mM, maior concentração não citotóxica à célula de levedura de acordo com Soares *et al.* (2005). A concentração de *Spirulina* foi medida indiretamente, através do peso molecular da ficocianina (seu principal pigmento) e considerando que essa representa até 20 % do peso seco da biomassa desta microalga.

3.2.2 Agente estressor

Como agente estressor foi utilizado o herbicida paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) nas concentrações de 0 mM, 10 mM e 15 mM.

3.2.3 Cultivos e tratamentos

Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 160 mL de meio de cultivo e 16 mL do inóculo (10 % do volume inicial). Os cultivos foram conduzidos para o agitador orbital termostaticado (150 rpm, 30 °C), para o crescimento da levedura em aerobiose. Para os tratamentos, aproximadamente 2×10^6 células/mL proveniente da

fase exponencial de crescimento foram tratadas com as soluções do antioxidante e do agente estressor.

Foram realizados tratamentos: tratamento controle (sem adição de estressor e de antioxidante); tratamento paraquat 10 mM e tratamento paraquat 15 mM (somente adição de paraquat nas concentrações 10 mM e 15 mM, respectivamente); tratamento paraquat 10 mM + *Spirulina* e tratamento paraquat 15 mM + *Spirulina* (com adição de *Spirulina* e paraquat nas concentrações 10 mM e 15 mM, respectivamente).

Após a adição do agente estressor e do antioxidante, os tratamentos foram conduzidos à incubação por 21 h a 28 °C para posterior análises.

3.2.4 Sobrevivência celular

Para a determinação da sobrevivência celular, procedeu-se o plaqueamento das células em meio contendo 2 % de glicose, 1 % de extrato de malte, 0,5 % de extrato de levedura, 0,02 % de fosfato de sódio monobásico e 2 % de agar. Após a semeadura as placas foram incubadas a 28 °C por 48 h. Procedeu-se à contagem das colônias em cada placa e determinou-se a sobrevivência celular em logaritmo de unidades formadoras de colônia (LOG UFC).

3.2.5 Sustâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA)

Para a quantificação da lipoperoxidação, foi realizada a análise de TBA (ácido tiobarbitúrico). Para a análise foram retirados 5 mL do tratamento e procedeu-se a sonificação por 20 min. Adicionou-se 2,5 mL de tricloroacético (TCA) 15 % e submeteu-se a mistura a centrifugação por 15 min a 3000 rpm. Adicionou-se 2,5 mL de TBA (0,28% em 90 % de ácido acético) a 2,5 mL do sobrenadante. Submeteu-se a mistura a banho maria (95 °C) por 30 min. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 532 nm. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry (LOWRY et. al., 1951).

3.2.6 Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico através da análise de variância e pós-teste de Tukey.

3.3 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA SPIRULINA EM RATOS FRENTE A PARÂMETROS DE ESTRESSE QUÍMICO

O Comitê de Ética da Universidade de Passo Fundo avaliou e aprovou o projeto para a realização deste estudo em reunião no dia 06 de agosto de 2008 (CEP 159/2008).

3.3.1 Grupos experimentais

Os estudos foram realizados com 32 ratos machos adultos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), pesando entre 250 a 300 g. Os experimentos de estresse oxidativo gerados por estresse químico foram distribuídos em 4 grupos experimentais. Cada grupo foi composto por 8 animais, sendo alocados 4 animais em cada gaiola. Os grupos experimentais foram divididos em grupo controle (C), grupo controle + glutamato (CG), grupo *Spirulina* LEB-18 + glutamato (SLEB-18) e grupo *Spirulina* Comercial + glutamato (SC). Os animais tiveram livre acesso a ração e água e foram mantidos em ciclos de 12/12 h claro/escuro.

3.3.2 Soluções administradas

A microalga *Spirulina* foi administrada aos animais na forma de suspensão aquosa, na dose referente à ingestão diária de *Spirulina* recomendada pela ANVISA para humanos, que é de 1,6 g, tendo como referência um indivíduo de 60 kg. Foram utilizadas duas diferentes biomassas da microalga: biomassa de *Spirulina* comercial (Santos Flora: ervas, especiarias e extratos secos - São Paulo) e biomassa de *Spirulina* LEB-18 (Laboratório de Engenharia Bioquímica, curso de Engenharia de Alimentos, Universidade do Rio Grande - RS). A administração da suspensão foi realizada por gavagem.

A dose de glutamato monossódico administrada nos ratos foi de 4 mg/g de peso corpóreo, em solução salina 0,9 %, tendo como referência Farombi e Onyema (2006). A administração foi realizada intraperitonealmente.

A solução salina administrada foi NaCl 0,9 % pH 7,0 (solução fisiológica).

3.3.3 Período de tratamento e procedimentos de administração das soluções

Os animais foram submetidos aos tratamentos durante um período de 8 dias. Durante os 8 dias de tratamento os grupos *Spirulina* (SLEB-18 e SC) receberam doses de suspensão da biomassa seca de *Spirulina* por meio de gavagem, essa administração representou o método de adaptação para posteriores teste de atuação da *Spirulina* como substância atenuadora do estresse oxidativo. Os grupos controle (C e CG) receberam solução salina 0,9 % (soro fisiológico), também por meio de gavagem, para promover as mesmas condições e/ou possíveis interferências em todos os grupos. No oitavo dia de tratamento, glutamato monossódico foi administrado, como promotor do estresse oxidativo, nos ratos dos grupos CG, SLEB-18 e SC via intraperitoneal. O grupo controle (C) foi tratado com solução salina 0,9 % via intraperitoneal para homogeneizar as condutas realizadas nos animais em tratamento.

3.3.4 Eutanásia

No oitavo dia, decorrida 1 h da aplicação do glutamato monossódico e da *Spirulina* os animais foram submetidos à eutanásia com guilhotina e então foi realizada a remoção do cérebro para análise.

3.3.5 Preparação do tecido e análises

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada de acordo com o método descrito por Esterbauer & Cheeseman (1990), que se baseia na determinação malonaldeído (MDA) devido a sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O córtex foi homogeneizado com solução de KCl 1,15 % na proporção 1:10. O índice de TBA foi quantificado em nmol de malonaldeído por grama de proteína (nmol malonaldeído/mg proteína).

Para a determinação da atividade enzimática específica da superóxido dismutase (SOD) foi utilizado o Kit Enzimático Ransod Cal (Randox Laboratories, Reino Unido), que utiliza a enzima xantina oxidase para a produção do radical superóxido. O córtex foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 50 mM + EDTA 1 mM pH 7,4, na proporção 1:10. O método baseia-se no uso de xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxido que reagem com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloretos feniltetrazol (INT), que forma um composto de coloração vermelha, o formazan. Os resultados foram

expressos em U SOD/mg proteína. Uma unidade da SOD corresponde a quantidade de enzima capaz de inibir em 50 % a redução do INT.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi quantificada segundo o método de Aebi (1984) o qual se baseia no acompanhamento da decomposição do H₂O₂ durante 5 minutos. O córtex foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,0, na proporção 1:10. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 µmol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto, e a atividade específica foi definida como unidades/mg de proteína.

A concentração de proteína foi medida pelo método de Lowry (1951).

Os resultados foram avaliados por análise de variância ANOVA, e teste de Tukey a 5% de significância.

3.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA SPIRULINA EM RATOS FRENTE A PARÂMETROS DE ESTRESSE FÍSICO

O Comitê de Ética da Universidade de Passo Fundo avaliou e aprovou o projeto para a realização deste estudo em reunião no dia 06 de agosto de 2008 (CEP 159/2008).

3.4.1 Grupos experimentais

Os estudos foram realizados com 32 ratos machos adultos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), pesando entre 250 e 300 g. Os experimentos de estresse oxidativo gerado por estressor físico foram distribuídos em 4 grupos experimentais. Cada grupo composto por 8 animais. Os grupos experimentais foram divididos em grupo controle (C), grupo controle + pânico (CP), grupo *Spirulina* (S) e grupo *Spirulina* + pânico (SP). Os animais foram mantidos em ciclos de 12/12 h claro e escuro e tiveram livre acesso a ração e água.

3.4.2 Soluções administradas

A dose de *Spirulina* administrada aos animais foi calculada tendo como referência a ingestão diária de *Spirulina* recomendada pela ANVISA, que é de 1,6 g. Utilizou-se a referência de uma pessoa de 60 kg. A biomassa da *Spirulina* utilizada foi a Cepa LEB-18,

obtida no Laboratório de Engenharia Bioquímica do curso de Engenharia de Alimentos da FURG-RS.

A solução salina administrada foi NaCl 0,9 % pH 7,0 (soro fisiológico).

3.4.3 Período de tratamento e procedimentos de administração das soluções

Os animais foram submetidos aos tratamentos durante um período de 8 dias. Durante os 8 dias de tratamento os grupos *Spirulina* (S e SP) receberam doses de suspensão da biomassa seca de *Spirulina*, via gavagem, para promover a adaptação para posteriores teste de atuação da *Spirulina* como substância atenuadora do estresse oxidativo. Os grupos controle (C e CP) receberam solução salina 0,9 % (soro fisiológico), também por meio de gavagem, para promover as mesmas condições e/ou possíveis interferências em todos os grupos. No oitavo dia de tratamento os grupos CP e SP foram submetidos a estresse físico por meio de pânico. Os animais foram alocados em campânulas por uma hora.

3.4.4 Eutanásia

No oitavo dia, após o período de uma hora nas campânulas, os animais foram submetidos a eutanásia com guilhotina e realizou-se a remoção do córtex para análise.

3.4.5 Preparação do tecido e análises

Os danos causados pelo estresse oxidativo (devido a formação de radicais livre) e a proteção antioxidante da *Spirulina* no córtex cerebral, foram determinados através do índice de TBA e também através da determinação das atividades enzimáticas da catalase (CAT) e da superóxido dismutase (SOD).

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada de acordo com o método descrito por Esterbauer & Cheeseman (1990), que se baseia na determinação malonaldeído (MDA) devido a sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O córtex foi homogeneizado com solução de KCl 1,15 % na proporção 1:10. O valor de TBA foi quantificado em nmol de malonaldeído por miligrama de proteína (nmol malonaldeído/mg proteína).

Para a determinação da atividade enzimática específica da superóxido dismutase (SOD) foi utilizado o Kit Enzimático Ransod Cal (Randox, Reino Unido), que utiliza a enzima xantina oxidase para a produção do radical superóxido. O córtex foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 50 mM + EDTA 1 mM pH 7,4, na proporção 1:10. O método baseia-se no uso de xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxido que reagem com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloretos feniltetrazol (INT), que forma um composto de coloração vermelha, o formazan. Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína. Uma unidade da SOD corresponde a quantidade de enzima capaz de inibir em 50 % a redução do INT.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi quantificada segundo o método de Aebi (1984) o qual se baseia no acompanhamento da decomposição do H₂O₂ durante 5 minutos. O córtex foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,0, na proporção 1:10. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 µmol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto, e a atividade específica foi definida como unidades/mg de proteína.

A concentração de proteína foi medida pelo método de Lowry (1951).

Os resultados foram avaliados por análise de variância ANOVA, e teste de Tukey a 5% de significância.

3.5 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA FICOCIANINA EM RATOS FRENTE A PARÂMETROS DE ESTRESSE QUÍMICO

O Comitê de Ética da Universidade de Passo Fundo avaliou e aprovou o projeto para a realização deste estudo em reunião no dia 06 de agosto de 2008 (CEP 159/2008).

3.5.1 Grupos experimentais

Os estudos foram realizados com 30 ratos machos adultos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), pesando entre 270 e 370 g. Os experimentos foram distribuídos em 5 grupos experimentais. Cada grupo composto por 6 animais, sendo alocados 3 animais em cada gaiola. Os animais receberam ração e água *ad libitum* e foram mantidos em ciclos de 12/12 h claro/escuro. Os grupos experimentais foram divididos em grupo controle (C), grupo controle + glutamato (CG), grupo ficocianina 1 +

glutamato (F1), grupo ficocianina 3 + glutamato (F3) e grupo ficocianina 5 + glutamato (F5).

3.5.2 Soluções administradas

As doses de ficocianina administradas aos animais foram de 1 mg/d para o grupo F1, 3 mg/d para o grupo F3 e 5 mg/d para o grupo F5, tendo como referência básica a quantidade de *Spirulina* recomendada pela ANVISA, 1,6 g/d, para um indivíduo de 60 kg e considerando que a ficocianina representa 20 % da microalga em peso seco. A ficocianina foi extraída da microalga *Spirulina*, cepa LEB-18, proveniente da planta de produção localizada em Santa Vitória do Palmar, pertencente ao Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG-RS, de acordo com PI 0801702-6 (KALIL et al., 2008).

A dose de monoglutamato de sódio administrada nos ratos será de 4 mg/g de peso corpóreo, tendo como referência Farombi e Onyema (2006).

A solução salina utilizada foi de NaCl 0,9 % pH 7,0.

3.5.3 Período de tratamento e procedimentos de administração das soluções

Os animais foram submetidos aos tratamentos durante um período de 8 dias. Durante os 8 dias de tratamento os grupos ficocianina (F1, F3 e F5) receberam doses da solução de ficocianina por gavagem, essa administração representa o método de adaptação para posteriores teste de atuação da mesma como substância atenuadora do estresse oxidativo. Os grupos controle (C e CG) receberam solução salina 0,9 % (soro fisiológico), também por meio de gavagem, para promover as mesmas condições e/ou possíveis interferências em todos os grupos. No oitavo dia de tratamento, o monoglutamato de sódio foi administrado, como promotor do estresse oxidativo (FAROMBI e ONYEMA, 2006), nos ratos dos grupos CG, F1, F3 e F5 via intraperitonal. O grupo controle (C) foi tratado com solução salina 0,9 %, via intraperitonal, para homogeneizar as condutas realizadas nos animais em tratamento.

3.5.4 Eutanásia

No oitavo dia, decorrida 1 h da aplicação do monoglutamato de sódio e da *Spirulina* os animais foram submetidos a eutanásia com guilhotina e procedeu-se a remoção do córtex cerebral para análise.

3.5.5 Preparação do tecido e análises

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada de acordo com o método descrito por Esterbauer & Cheeseman (1990), que se baseia na determinação malonaldeído (MDA) devido a sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O córtex foi homogeneizado com solução de KCl 1,15 % na proporção 1:10. O índice de TBA foi quantificado em nmol de malonaldeído por grama de proteína (nmol malonaldeído/mg proteína).

Para a determinação da atividade enzimática específica da superóxido dismutase (SOD) foi utilizado o Kit Enzimático Ransod Cal (Randox, Reino Unido), que utiliza a enzima xantina oxidase para a produção do radical superóxido. O córtex foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 50 mM + EDTA 1 mM pH 7,4, na proporção 1:10. O método baseia-se no uso de xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxido que reagem com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloretos feniltetrazol (INT), que forma um composto de coloração vermelha, o formazan. Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína. Uma unidade da SOD corresponde a quantidade de enzima capaz de inibir em 50 % a redução do INT.

A atividade da enzima catalase (CAT) foi quantificada segundo o método de Aebi (1984) o qual se baseia no acompanhamento da decomposição do H_2O_2 durante 5 minutos. O córtex foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,0, na proporção 1:10. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μ mol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto, e a atividade específica foi definida como unidades/mg de proteína.

A concentração de proteína foi medida pelo método de Lowry (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

A avaliação dos resultados foi realizada através da análise de variância ANOVA, e teste de Tukey a 5% de significância.

CAPÍTULO IV

DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

**CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM
CÉLULAS DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* SUBMETIDAS AO
ESTRESSOR PARAQUAT**

Cíntia GUARIENTI^{1*}, Telma Elita BERTOLIN², Jorge Alberto Vieira COSTA³

1 Univerddidade Federal do Rio Grande – FURG. Programa de Pos-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Rua Alfredo Huch, 475 – Rio Grande/RS/Brasil. CEP 96201-900. Fone: (53) 3233 8653. E-mail: *cguarienti@yahoo.com.br

2 Universidade de Passo Fundo – UPF, Curso de Engenharia de Alimentos, Laboratório de Fermentações, Bairro São José, Caixa Postal – 611. CEP 99001-970 – Passo Fundo/RS, Brasil. Fone: (54) 3316 8193. E-mail: telma@upf.br

3 Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Programa de Pos-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. Rua Alfredo Huch, 475 – Rio Grande/RS/Brasil. CEP 96201-900. Fone: (53) 3233 8653. E-mail: dqmjorge@furg.br

Artigo submetido a Revista do Instituto Adolfo Lutz

CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA MICROALGA *Spirulina platensis* EM CÉLULAS DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* SUBMETIDAS AO ESTRESSOR PARAQUAT

RESUMO

Os inúmeros estudos que têm mostrado alta correlação entre a geração de radicais livres e as doenças crônico-degenerativas, vêm conduzindo o interesse por alimentos funcionais antioxidantes. O excesso de espécies reativas no organismo resulta no estresse oxidativo que provoca danos celulares e teciduais. A microalga *Spirulina* vem sendo estudada devido a suas propriedades nutricionais e antioxidantes. O objetivo desse trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante da microalga *Spirulina* tendo como modelo biológico a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, submetida ao estressor 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio (paraquat), nas concentrações 0, 10 e 15 mM. O potencial antioxidante foi avaliado pela sobrevivência celular (plaqueamento) e pela lipoperoxidação (valores de TBA). Os resultados mostraram que a sobrevivência celular aumentou de forma significativa ($p \leq 0,05$) nos tratamentos com paraquat e *Spirulina*, quando comparado com os que receberam somente o tratamento com paraquat. O agente estressor gerou aumento significativo ($p \leq 0,05$) na lipoperoxidação (valores de TBA), o qual foi atenuado pelo tratamento com *Spirulina*, não diferindo do tratamento controle ($p > 0,05$). Os resultados mostram que a microalga *Spirulina* apresentou capacidade antioxidante, protegendo as células da levedura contra os danos oxidativos provocados pelo paraquat.

Palavras chave: antioxidante, estresse oxidativo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Spirulina*

INTRODUÇÃO

O interesse de diferentes segmentos, dentre eles a indústria de alimentos, por componentes bioquímicos ativos, também denominados alimentos funcionais, tem sido fundamentado nas questões qualidade de vida, longevidade e saúde. O termo funcional aplicado aos alimentos tem assumido diferente conotação que é a de proporcionar um benefício fisiológico adicional, além daquele de satisfazer as necessidades nutricionais básicas¹. Um dos fatores que pode caracterizar um alimento como funcional é seu potencial como antioxidante.

Os antioxidantes atuam como varredores de radicais livres (RL) e espécies reativas de oxigênio (ERO). A produção destas espécies reativas é parte integrante do metabolismo humano, sendo observada em diversas condições fisiológicas desempenhando papel fundamental no metabolismo celular. O excesso de radicais livres pode gerar o estresse oxidativo, o que pode conduzir a alterações teciduais responsáveis por diversas patologias². O estresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante³, sendo o sistema oxidante predominante e responsável por citotoxicidade em vários tipos de células. Entre os diversos agentes oxidantes existentes, encontra-se o herbicida paraquat (1,1-dimetil-4,4' bipyridílio), que é uma fonte exógena de radicais livres⁴. O paraquat em presença de NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo) gera o radical paraquat, superóxido e hidroxila^{4,5}. O paraquat reage com o NADPH sofrendo uma redução por ação da enzima NADPH-citocromo P₄₅₀ redutase, o que resulta na geração de um radical paraquat. Entretanto, sob condições aeróbicas, esse elétron é transferido ao oxigênio, que se transforma em ânion superóxido (O₂^{•-})^{6,7}.

Embora o organismo disponha de efetivas defesas antioxidantes para neutralizar os radicais livres, dentre elas as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona (GX), existem situações fisiológicas promotoras de estresse oxidativo, onde a suplementação com antioxidantes exógenos apresenta relevante importância para manter o equilíbrio entre pró e antioxidantes. A crescente busca por produtos com atividade antioxidante em terapias preventivas relacionadas ao estresse oxidativo, confere atenção especial aos produtos naturais⁴.

A *Spirulina* é uma cianobactéria consumida a milhares de anos por Astecas e Maias como fonte de alimentação primária, que contem elevados níveis de antioxidante, como por exemplo, carotenóides⁸, especialmente beta-caroteno⁹ e ficocianina, que é seu pigmento principal¹⁰. A microalga *Spirulina* apresenta características que sugerem aplicações clínicas que revelam os efeitos terapêuticos da mesma em pacientes acometidos de diversas patologias¹¹. A *Spirulina* vem sendo fonte de pesquisa devido a evidências de seu potencial terapêutico na prevenção e diminuição dos danos causados por dislipidemias e sua atuação como composto com atividade antioxidante¹².

A avaliação da capacidade antioxidante empregando animais de laboratório é, em geral, de difícil execução e necessita de um número elevado de animais para assegurar resultados significativos. Os ensaios realizados com microrganismos são fáceis, rápidos e podem utilizar um grande número de células com as mesmas características genéticas. A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sob o ponto de vista genético e metabólico, é um dos organismos mais utilizados em testes biológicos¹³. Várias razões tornam a levedura *Saccharomyces cerevisiae* um modelo de sistema eucariótico unicelular para estudos de estresse oxidativo. Seu metabolismo é semelhante ao de eucariotos superiores, com mecanismos próprios de ativação metabólica (citocromo P450) e de detoxificação, que não estão presentes em bactérias^{14,13}. A avaliação da capacidade antioxidante pode ser realizada pela medida da sobrevivência de células tratadas com o antioxidante e agentes estressores, como por exemplo, a apomorfina, o paraquat^{14,15,16}, glutamato monossódico^{17,18}.

Neste contexto, objetivou-se avaliar a capacidade antioxidante da microalga *Spirulina platensis* na viabilidade celular e na lipoperoxidação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente ao estresse oxidativo gerado pela adição de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo (paraquat).

MATERIAL E MÉTODOS

Antioxidante

Foi analisada como substância antioxidante a biomassa da microalga *Spirulina*, Cepa LEB-18. A concentração de *Spirulina* utilizada nos ensaios foi 0,025 mM, maior

concentração não citotóxica de antioxidante para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*¹⁹. A medida da concentração de *Spirulina* foi realizada indiretamente, utilizando o peso molecular de seu principal pigmento (ficocianina) e considerando que este representa 20 % da microlaga.

Agente estressor

Como agente estressor foi utilizado o 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio (paraquat), nas concentrações 0 mM, 10 mM e 15 mM.

Cultivos e tratamentos

Os cultivos foram realizados em erlenmeyers de 250 mL, contendo 160 mL de meio de cultivo e 16 mL do inóculo (10 % do volume inicial). Os cultivos foram conduzidos para o agitador orbital termostaticado (150 rpm, 30 °C), para o crescimento da levedura em aerobiose. Para os tratamentos, aproximadamente 2×10^6 células/mL proveniente da fase exponencial de crescimento foram tratadas com as soluções do antioxidante e do agente estressor.

Foram realizados tratamentos: tratamento controle (sem adição de estressor e de antioxidante); tratamento paraquat 10 mM e tratamento paraquat 15 mM (somente adição de paraquat nas concentrações 10 mM e 15 mM, respectivamente); tratamento paraquat 10 mM + *Spirulina* e tratamento paraquat 15 mM + *Spirulina* (com adição de *Spirulina* e paraquat nas concentrações 10 mM e 15 mM, respectivamente).

Após a adição do agente estressor e do antioxidante, os tratamentos foram conduzidos à incubação por 21 h a 28 °C para posterior análises.

Sobrevivência celular

Para a determinação da sobrevivência celular, procedeu-se o plaqueamento das células em meio contendo 2 % de glicose, 1 % de extrato de malte, 0,5 % de extrato de levedura, 0,02 % de fosfato de sódio monobásico e 2 % de agar. Após a semeadura as

placas foram incubadas a 28 °C por 48 h. Procedeu-se à contagem das colônias em cada placa e determinou-se a sobrevivência celular em logaritmo de unidades formadoras de colônia (LOG UFC).

Lipoperoxidação

Para a quantificação da lipoperoxidação, foi realizada a análise de TBA (ácido tiobarbitúrico). Para a análise foram retirados 5 mL do tratamento e procedeu-se a sonificação por 20 min. Adicionou-se 2,5 mL de tricloroacético (TCA) 15 % e submeteu-se a mistura a centrifugação por 15 min a 3000 rpm. Adicionou-se 2,5 mL de TBA (0,28% em 90 % de ácido acético) a 2,5 mL do sobrenadante. Submeteu-se a mistura a banho maria (95 °C) por 30 min. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 532 nm. A quantificação das proteínas foi realizada pelo método de Lowry²⁰. O valor de TBA foi quantificado em nmol de malonaldeído por miligrama de proteína (nmol malonaldeído/mg proteína).

Análise Estatística

Os resultados foram submetidos a tratamento estatístico através da análise de variância e pós-teste de Tukey a 5 % de significância ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise estatística dos resultados referentes a Tabela 1 mostra diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$). Os grupos tratados com estressor (paraquat 10 mM e paraquat 15 mM) apresentaram níveis de sobrevivência celular estatisticamente inferiores ao controle, indicando morte celular causada pelo estressor. Este resultado mostra que concentrações de paraquat 10 mM e 15 mM exercem efeito citotóxico sobre células de levedura. Quando se analisa a adição da microalga *Spirulina* com o agente estressor paraquat (10 e 15 mM) verifica-se que a sobrevivência celular aumenta, chegando a valores estatísticos iguais ao tratamento controle.

Os resultados de sobrevivência celular também foram analisados através da comparação dos valores percentuais de sobrevivência da levedura tratada somente com o paraquat, e tratada com esse agente estressor adicionado de *Spirulina*, como agente antioxidante. A contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC) do tratamento controle representa 100 % de sobrevivência, pois não teve influência dos agentes estressor e antioxidante. As sobrevivências celulares da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com paraquat foram de 39,4 % e 17,1 % quando usadas as concentrações 10 mM e 15 mM, respectivamente. A adição da *Spirulina* aos tratamentos elevou a sobrevivência para 54,8 % e 57,8 %, respectivamente, mostrando aumento 15,3 % para a concentração 10 mM de paraquat e 40,8 % para a concentração 15 mM (Figura 1).

Resultados semelhantes, de aumento no percentual de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foram encontrados por Soares *et al.* (2004)²¹ utilizando o estressor paraquat nas concentrações 10 mM e 15 mM e o BHT (butilhidroxitolueno) como agente antioxidante, sendo o aumento de 19,95 % e 20,92 % quando usadas as concentrações 10 e 15 mM, respectivamente.

O tratamento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com *Spirulina* e paraquat na concentração de 15 mM, mostrou aumento do percentual de sobrevivência (40,8 %) superior ao valor experimental encontrados por Soares *et al.* (2005)¹⁹ (32 %), que testaram naringinina como antioxidante frente a apomorfina como agente estressor.

A *Spirulina* foi capaz de proteger as células da levedura dos danos oxidativos causados pelo paraquat em ambas as concentrações testadas, porém a atividade da *Spirulina* foi mais pronunciada quando se utilizou a concentração 15 mM de paraquat.

Os grupos que receberam o agente estressor (paraquat), em ambas as concentrações, apresentaram valores de TBA significativamente superiores aos tratamentos com *Spirulina platensis* (Tabela 2). Considerando que o TBA reflete a quantidade de malonaldeído, o aldeído individual mais abundante resultante da peroxidação lipídica²² estes resultados indicam que o herbicida paraquat promove a peroxidação e a *Spirulina* atua minimizando este efeito deletério nas células da levedura.

O estresse oxidativo como componente do processo metabólico e a excitocidade são responsáveis pelo desenvolvimento de neurodegenerações^{23,24,25,26}. Estes eventos refletem um desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (ERO) e sua degradação pelo sistema

antioxidante^{27,28}. Este desequilíbrio pode ser originário de uma superprodução de ERO e/ou uma redução nas defesas antioxidantes^{29,30,31}.

A atuação da microalga *Spirulina* na manutenção dos parâmetros avaliados mostra uma atenuação dos radicais livres e dos danos gerados. Essa proteção antioxidante reforça a teoria de Pompella (1997)³², que ressalta a importante relação entre a inclusão de antioxidantes na dieta e a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres.

Estes resultados reforçam a idéia dos benefícios da utilização de antioxidantes em alimentos, cosméticos e medicamentos, que foram comprovados em diversos estudos^{33,34,35,36,4}, por isso a busca crescente de estudos a cerca da capacidade antioxidante de compostos naturais devem ser realizados, a fim de que possam vir a substituir os antioxidantes sintéticos como o BHT, sem prejuízo da capacidade antioxidante e sem os efeitos indesejáveis relatados para os mesmos³⁷.

Conclusão

O uso da *Spirulina* em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com paraquat 10 e 15 mM aumentou a sobrevivência celular em 15,3 % e 40,8 %, respectivamente.

Os valores de TBA encontrados para o tratamento com 10 mM de paraquat + *Spirulina* e 15 mM de paraquat + *Spirulina* foram significativamente inferiores aos tratados com paraquat 10 e 15 Mm e não diferiram do controle.

Os resultados de atenuação do estresse oxidativo da levedura *Saccharomyces cerevisiae* frente ao estressor 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio (paraquat), pela *Spirulina*, corroboram com os resultados já existentes de seu potencial antioxidante.

ABSTRACT**ANTIOXIDANT CAPACITY OF MICROALGAE *Spirulina platensis* IN
Saccharomyces cerevisiae YEAST CELLS SUBMITTED TO PARAQUAT
ESTRESSOR**

The innumerable studies that have shown high correlation between free radicals generation and the chronic-degenerative illnesses, come leading the interest for antioxidant functional foods. The reactive species excess in the organism results in oxidative stress that provokes cellular and teciduais damages. The microalgae *Spirulina* comes being studied because its nutritional and antioxidant properties. The objective of this work was to evaluate antioxidant capacity of the microalgae *Spirulina* being had as biological model the *Saccharomyce cerevisiae* yeast, submitted to the estressor 1,1' - dimetil-4,4' - bipyridilio (paraquat), in concentrations 0, 10 and 15 mM. The antioxidant potential was evaluated by the cellular survival and by the lipoperoxidation (values of TBA). The results had shown that the cellular survival increased of significant form ($p \leq 0,05$) in the treatments with paraquat and *Spirulina*, when compared with that had only received the treatment with paraquat. The estressor agent generated significant increase ($p \leq 0,05$) in the lipoperoxidation (values of TBA), which was attenuated by the treatment with *Spirulina*, not differing from controlled treatment ($p > 0,05$). The results show that the microalgae *Spirulina* presented antioxidant capacity, protecting yeast cells against the oxidative damages provoked by paraquat.

Key words: antioxidant, oxidative stress, *Saccharomyces cerevisiae*, *Spirulina*

TABELAS

Tabela 1 Sobrevivência celular para os diferentes tratamentos das células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

TRATAMENTOS	SOBREVIVÊNCIA CELULAR (Log UFC)
Controle	8,53 ± 0,06 ^a
Paraquat 10 mM	8,04 ± 0,05 ^b
Paraquat 15 mM	7,78 ± 0,16 ^b
Paraquat 10 mM + <i>Spirulina</i>	8,38 ± 0,09 ^a
Paraquat 15 mM + <i>Spirulina</i>	8,37 ± 0,06 ^a

*Letras diferentes indicam diferença estatística pelo teste de Tukey a 5 % de significância

Tabela 2 Índice de TBA da levedura *Saccharomyces cerevisiae* para os tratamentos com paraquat em presença e ausência de *Spirulina*

TRATAMENTOS	TBA* (nmol malonaldeído/mg de proteína)
Controle	6,64±0,14 ^a
Paraquat 10 Mm	9,58±0,27 ^b
Paraquat 15 Mm	9,86±0,98 ^b
Paraquat 10 mM + <i>Spirulina</i>	5,35±0,22 ^a
Paraquat 15 mM + <i>Spirulina</i>	5,81±1,35 ^a

* Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

FIGURAS

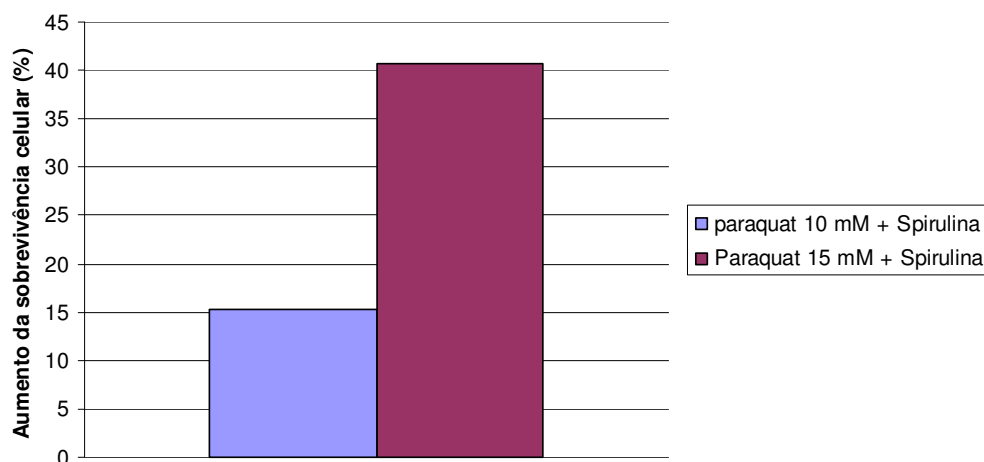


Figura 1 Aumento do percentual de sobrevivência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratada com *Spirulina* em presença de paraquat

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hasler, C. M. Functional Foods for Health Program. Department of Food Science and Human Nutrition da University of Illinois. Food Technol. 1998; 52, 57-62.
2. Drodge, W. Free radical in the physiological control of cell function. Phys. Rev. 2002; 41, 47 -95.
3. Finkel, T.; Holbrook, N.J. Nature (London, U.K.) 2000; 408, 239.
4. Halliwell B.; Gutteridge, J.M.C. Free Rad. in Biol. and Med. 3 ed. Clarendon. Oxford, 2000.
5. Bulkeley, G.B. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. Surgery. 1993; 113, 479-483.
6. Smith, P.; Heath, D. Paraquat. CRC Crit. Rev. Toxicol. 1976; 4, 411-45.
7. Farrington, J. A. et al. Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. Biochem. Biophys. Acta. 1973; 314, 372-81.
8. Annapura, V.V.; Deosthale, Y.G.; Bamji, M.S. *Spirulina* as a source of vitamin A. Plant Foods Hum. Nutr. 1991; 41, 125-134.
9. Careri, M.; Furlattini, L.; Mangia, A.; Musc, M.; Anklam, E.; Theobald, A.; Von Holst, C. Supercritical fluid extraction for liquid chromatographic determination of carotenoids in *Spirulina* Pacifica algae: a chemometric approach. J. Chromat. 2001; 912, 61-71.

10. Reddy, C.M.; Bhat, V.B.; Kiranmai, G.; Reddy, M.N.; Reddanna, P.; Madyastha, K.M. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycoerythrin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000; 277, 599-603.
11. Richmond, A. *Handbook of Microalgal Mass Culture*. Boston: CRC Press. ISBN 0-84933240-0. 1990.
12. Belay, A. The potential application of *Spirulina (Arthrospira)* as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *J. of the American Nutraceutical Assoc.* 2002; 5 (2), 27-48.
13. Henriques, J.A.P.; Dafré, A.L.; Picada, J.N.; Marisa, A.F.; Salvador, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidante em sistemas biológicos. In: Serafini, L.A.; Barros, N.M.; Azevedo, J.L. *Biotechnol. na Agricult. e na Agroind.* Guaíba: Agropecuária. 2001; 1, 227-252.
14. Soares, D.G.; Andreazza, A.C.; Salvador, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. *J. Agric. Food Chem.* 2003; 51, 1077-1080.
15. Espín, J.C.; Soler-Rivas, C.; Wichers, H.J. Characterization of the total free scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2 diphenyl- 1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* 2000; 48, 648-656.
16. Benzie, I. F. F.; Szeto, Y. T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 1999; 47, 633-636.

17. Farombi, E.O.; Onyema, O.O. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. *Hum. Exp. Toxicol.* 2006; 25, 251-259.
18. Diniz, Y.S. Toxicity of hipercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. *Food Chemical Toxicol.* 2004; 42, 313-319.
19. Soares, D.G.; Andreazza, A.C.; Salvador, M. Avaliação de compostos antioxidantes em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian J. of Pharm. Sci.* 2005; 41.
20. Lowry, H.O.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol. Chem.* 1951; 193, 265-275.
21. Soares, D.G.; Andreazza, A.C.; Salvador, M. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo biológico para avaliação da capacidade antioxidante de compostos. *Rev. Bras. Farm.* 2004; 85, 45-47.
22. Esterbauer, H.; Cheeseman, K., Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynoneal. *Method. Enzymol.* 1990; 186, 407-408.
23. Rodrigues, C.M.; Spellman, S.R.; Sola, S.; Grande, A.W.; Linehan-Stieers, C.; Low, W.C.; Steer, C.J. Neuroprotection by a bile acid in an acute stroke model in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2002; 22, 463–471.
24. Alexi, T.; Borlongan, C.V.; Faull, R.L.; Williams, C.E.; Clark, R.G.; Gluckman, P.D.; Hughes, P.E. Neuroprotective strategies for basal ganglia degeneration: Parkinson's and Huntington's diseases. *Prog. Neurobiol.* 2000; 60, 409–470.
25. Bruce-Keller, A.J.; Umberger, G.; Mcfall, R.; Mattson, M.P. Food restriction reduces brain damage and improves behavioral outcome following excitotoxic and metabolic insults. *Ann. Neurol.* 1999; 45, 8–15.

26. Mattson, M.P.; Pedersen, W.A.; Duan, W.; Culmsee, C.; Camandola, S. Cellular and molecular mechanisms underlying perturbed energy metabolism and neuronal degeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1999; 893, 154–175.
27. Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 1984; 219, 1–14.
28. Freeman, B.A.; Crapo, J.D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 1982; 47, 412–426.
29. Ahmad, M.; Yousuf, S.; Khan, M.B.; Hoda, M.N.; Ahmad, A.S.; Ansari, M.A.; Ishaq, T.; Agrawal, A.K.; Islam, F. Attenuation by *Nardostachys jatamansi* of 6-hydroxydopamine-induced parkinsonism in rats: behavioral, neurochemical, and immunohistochemical studies. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2006; 83, 150–160.
30. Butterfield, D.A.; Koppal, T.; Subramaniam, R.; Yatin, S. Vitamin E as an antioxidant/free radical scavenger against amyloid beta-peptide-induced oxidative stress in neocortical synaptosomal membranes and hippocampal neurons in culture: insights into Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* 1999; 10, 141–149.
31. Jenner, P.; Olanow, C.W. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurol.* 1996; 47, 161-170.
32. Pompella, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *Intern. J. Vitamin Nutrit. Res.* 67, 289-297. 1997.
33. Dalla Corte, C.L. Avaliação dos efeitos do tratamento crônico com neurolépticos e sua interação com substâncias potencialmente antioxidantes sobre parâmetros de estresse oxidativo no fígado e rim de ratos. [Dissertação de mestrado do Programa de Pós-

Graduação em Ciências Biológicas – Bioquímica Toxicológica]. Santa Maria – RS. Universidade Federal de Santa Maria. 2008.

34. Dani, C.; Pasquali, M.A.B.; Oliveira, M.R.; Umezu, F.M.; Salvador, M.; Henriques, J.A.P.; Moreira, J.C.F. Protective effects of purple grape juice on carbon tetrachloride-induced oxidative stress in brain of adult wistar rats. *J. Med. Food.* 2008; 11, 55-61.

35. Wagner, C.; Fachineto, R.; Dalla Corte, C.L.; Brito, V.B.; Severo, D.; Dias, G.O.C.; Morel, A.F.; Nogueira, C.W.; Rocha, J.B.T. Quercitrin, a glycoside form of quercetin, prevents lipid peroxidation in vitro. *Brain Res.* 2006; 192-198.

36. Ko, S.H.; Choi, S.W.; Ye, S.K.; Cho, B.L.; Kim, H.S.; Chung, M.H. Comparison of the antioxidant activities of nine different fruits in human plasma. *J. Medic. Food.* 2005; 8, 41-46.

37. Zeiger, E. Mutagenicity of chemicals added to food. *Mutation Res.* 1999; 250:53-61.

**USO DA MICROALGA *Spirulina* NA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO
CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS**

GUARIENTI, Cíntia; BERTOLIN, Telma Elita; COSTA, Jorge Alberto Vieira

USO DA MICROALGA *Spirulina* NA ATENUAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO NO CÓRTEX CEREBRAL DE RATOS

RESUMO

A *Spirulina* é uma microalga que apresenta características antioxidantes, pois atua no combate aos radicais livres. O excesso de radicais livres ou a diminuição das defesas antioxidantes enzimáticas dos organismos gera o chamado estresse oxidativo, que provoca danos teciduais e celulares. Objetivou-se avaliar a capacidade antioxidante da *Spirulina* frente a parâmetros de estresse oxidativo, químico ou físico, em córtex de ratos submetidos à administração de glutamato monossódico ou situação de pânico, respectivamente. O período de tratamento foi de 8 dias, sendo as suspensões de *Spirulina* administradas por gavagem durante todo o tratamento. A solução de glutamato monossódico foi administrada via intraperitoneal e o estresse por pânico foi realizado através da alocação dos animais em campânulas, ambos procedimentos efetuados somente no oitavo dia de tratamento. O córtex cerebral dos animais foi removido e homogeneizado para a avaliação dos índices de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), e atividade específica das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os resultados mostram que, tanto o estresse químico quanto o físico, provocaram aumento significativo ($p < 0,05$) dos índices de TBA e diminuição da enzima CAT em relação ao grupo controle. Para a enzima SOD, observou-se que no estresse químico houve diminuição significativa ($p = 0,003$) desses níveis, enquanto no estresse físico houve aumento significativo ($p = 0,009$). O uso de *Spirulina* foi capaz de atenuar o aumento do índice de TBA e as alterações das atividades das enzimas SOD e CAT, mantendo estes parâmetros em níveis estatisticamente iguais ao grupo controle.

Palavras-chave: antioxidante; córtex; estresse oxidativo; *Spirulina*

INTRODUÇÃO

O aumento na expectativa de vida da população tem desencadeado crescentes interesses nos estudos relacionados a diferentes patologias, como câncer, Alzheimer, Parkinson. Uma vertente destes estudos demonstra que o estresse oxidativo tem um papel importante na origem de processos neurodegenerativos. Esta teoria é fortalecida

pelo fato de que os neurônios são altamente propensos a situações de estresse oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2006).

Os radicais livres gerados *in vivo* reagem com o DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras (JACOB e BURRI, 1996), possivelmente por desestabilização das membranas (MORA *et al.*, 1990), dano no DNA (TAKABE *et al.*, 2001), e oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL). De acordo com RAMARATHNAM *et al.* (1995), a autooxidação dos ácidos graxos insaturados que compõem a membrana celular, é apontado como o processo oxidativo de maior ocorrência no organismo humano (MELLO e GUERRA, 2002). No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres, moléculas ou fragmentos de moléculas que possuem elétron livre, dito não pareado, em sua órbita externa. Os elétrons livres dessas moléculas as tornam quimicamente instáveis e, portanto, bastante reativas (CHEESEMAN e SLATER, 1996).

O estresse oxidativo é definido como a situação na qual a formação de espécies reativas excede significativamente a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo, tendo como consequência o aumento de danos a biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Estes danos, quando não reparados, acabam comprometendo o funcionamento da célula, levando-a a morte por apoptose ou necrose (HALLIWELL, 2001). Existem várias formas de estresse e todas podem desencadear distúrbios no cérebro. O estresse oxidativo pode ser gerado por meios químicos ou físicos. No primeiro caso, alguma substância química promove o estresse oxidativo, como por exemplo, o glutamato monossódico, que é um realçador de sabor muito utilizado na indústria de alimentos. Os neurônios utilizam extensamente o glutamato como neurotransmissor. A morte celular e disfunções metabólicas podem causar aumento de glutamato extracelular, elevando a concentração de cálcio (Ca^{+2}) intracelular a níveis patológicos (HALLIWELL, 2001). No estresse físico, uma resposta momentânea do organismo a um estímulo, que se dá através da liberação de hormônios que excitam o cérebro, desperta os instintos básicos de fuga ou luta. O estresse torna-se uma expressão de sofrimento humano quando excede a sua função original. Nesta situação não é mais uma forma rápida de reação do organismo a um fator inesperado, mas sim um problema que provoca no cérebro uma tensão incessante para a qual o órgão não foi geneticamente preparado, provocando o estresse oxidativo (PÓVOA *et al.*, 2005).

Os organismos aeróbios dispõem de um sistema celular de defesa contra as ERO, são as chamadas defesas antioxidantes primárias que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). A enzima superóxido dismutase é responsável por catalisar a reação de radicais superóxido com formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que é menos reativo e pode ser eliminado por ação de outras enzimas como a catalase e a glutatona peroxidase (EATON, 1991). Além das defesas antioxidantes enzimáticas existem as defesas antioxidantes não enzimáticas. Os antioxidantes não enzimáticos podem ser definidos como quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, quando comparadas a um agente oxidante, são capazes de prevenir a oxidação do substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Segundo CRYSTAL (1991), os antioxidantes são compostos que funcionam como bloqueadores dos processos óxido-redutivos desencadeados pelos radicais livres.

A *Spirulina* é uma microalga cujo perfil nutricional a torna ideal como alimento, pois substitui satisfatoriamente outras fontes de nutrientes, por combinar diversos constituintes de maneira equilibrada (AMBROSI *et al.*, 2008). Os primeiros relatos do uso da *Spirulina* na alimentação datam da pré-história, a partir da informação de que tribos de caçadores coletavam massas gelatinosas de algas verde-azuladas e as consumiam cruas ou cozidas. Para enriquecer suas dietas, também consumiam algas filamentosas coletadas em lagos alcalinos, as quais são conhecidas como sendo do gênero *Spirulina* (RICHMOND, 1990). A *Spirulina* é uma microalga caracterizada pelo elevado conteúdo de proteínas (60-70 %), carotenóides, vitamina E, ficocianina e clorofila (NAKAYA *et al.*, 1998). Miranda *et al.* (1998) demonstraram a capacidade antioxidante do extrato de *Spirulina in vivo* e *in vitro*. Premkumar *et al.* (2001) verificaram que o pré-tratamento com *Spirulina* reduz o estresse oxidativo e a toxicidade induzida em ratos e Upasani *et al.* (2001) relataram que a microalga previne a peroxidação lipídica.

O objetivo deste trabalho foi verificar a capacidade antioxidante da microalga *Spirulina*, através da análise de córtex de ratos que sofreram indução de estresse oxidativo pela substância glutamato monossódico e pelo estresse gerado por situação de pânico.

MATERIAL E MÉTODOS

ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO

Animais e grupos experimentais

Os estudos foram realizados com 32 ratos machos adultos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), pesando entre 250 a 300 g. Os experimentos de estresse oxidativo gerados por estresse químico foram distribuídos em 4 grupos experimentais. Cada grupo foi composto por 8 animais, sendo alocados 4 animais em cada gaiola. Os grupos experimentais foram divididos em grupo controle (C), grupo controle + glutamato (CG), grupo *Spirulina* LEB-18 + glutamato (SLEB-18) e grupo *Spirulina* Comercial + glutamato (SC). Os animais tiveram livre acesso à ração e água e foram mantidos em ciclos de 12/12 h claro/escuro.

Suspensão de *Spirulina*

A microalga *Spirulina* foi administrada aos animais na forma de suspensão aquosa, na dose referente à ingestão diária de *Spirulina* recomendada pela ANVISA para humanos, que é de 1,6 g, tendo como referência um indivíduo de 60 kg. Foram utilizadas duas diferentes biomassas da microalga: biomassa de *Spirulina* comercial (Santos Flora: ervas, especiarias e extratos secos - São Paulo) e biomassa de *Spirulina* LEB-18 (Laboratório de Engenharia Bioquímica, FURG-RS). A administração da suspensão foi realizada por gavagem.

Solução de glutamato monossódico

A dose de glutamato monossódico administrada nos ratos foi de 4 mg/g de peso corpóreo, em solução salina 0,9 %, tendo como referência Farombi e Onyema (2006). A administração foi realizada intraperitonealmente.

Período de tratamento e procedimentos de administração das soluções

Os animais foram submetidos aos tratamentos durante um período de 8 dias. Durante os 8 dias de tratamento os grupos *Spirulina* (SLEB-18 e SC) receberam doses de suspensão da biomassa seca de *Spirulina* por meio de gavagem, essa administração representou o método de adaptação para posteriores teste de atuação da *Spirulina* como substância atenuadora do estresse oxidativo. Os grupos controle (C e CG) receberam

solução salina 0,9 % (soro fisiológico), também por meio de gavagem, para promover as mesmas condições e/ou possíveis interferências em todos os grupos. No oitavo dia de tratamento, a solução de glutamato monossódico foi administrada, como promotor do estresse oxidativo, nos ratos dos grupos CG, SLEB-18 e SC via intraperitoneal. O grupo controle (C) foi tratado com solução salina 0,9 % via intraperitoneal para homogeneizar as condutas realizadas nos animais em tratamento.

Os animais foram submetidos a eutanásia com guilhotina, após 1 h da aplicação do tratamento com glutamato monossódico. O córtex dos animais foi imediatamente removido e homogeneizado para análise.

ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR SITUAÇÃO DE PÂNICO

Animais e grupos experimentais

Os estudos foram realizados com 32 ratos machos adultos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), pesando entre 250 e 300 g. Os experimentos de estresse oxidativo gerado por estressor físico (pânico) foram distribuídos em 4 grupos experimentais. Cada grupo composto por 8 animais, sendo alocados 4 animais em cada gaiola. Os grupos experimentais foram divididos em grupo controle (C), grupo controle + pânico (CP), grupo *Spirulina* (S) e grupo *Spirulina* + pânico (SP). Os animais foram mantidos em ciclos de 12/12 h claro e escuro e tiveram livre acesso a ração e água.

Suspensão de *Spirulina*

A dose de *Spirulina* administrada aos animais foi calculada tendo como referência a ingestão diária de *Spirulina* recomendada pela ANVISA, que é de 1,6 g. Utilizou-se a referência de uma pessoa de 60 kg. A biomassa da *Spirulina* utilizada foi a Cepa LEB-18, obtida no Laboratório de Engenharia Bioquímica da FURG-RS. A biomassa foi administrada na forma de suspensão aquosa via gavagem.

Procedimento experimental

Os animais foram submetidos aos tratamentos durante um período de 8 dias. Durante os 8 dias de tratamento os grupos controle (C) e controle + pânico (CP)

receberam solução salina 0,9 % (soro fisiológico) por meio de gavagem e o grupo *Spirulina* + pânico (SP) recebeu suspensão da biomassa seca de *Spirulina* também por gavagem. A administração prévia da suspensão de *Spirulina* antes do processo de indução ao estresse oxidativo (7 primeiros dias de tratamento) foi realizado para adaptação dos animais a suspensão permitindo a posterior avaliação da capacidade antioxidante da mesma. A administração de solução salina aos grupos controle (C) e controle + pânico (CP) foi realizada pra homogeneizar as condutas em todos os animais. No oitavo dia de tratamento, os grupos controle + pânico (CP) e *Spirulina* + pânico (SP) foram submetidos à alocação em campânulas por uma hora para simular uma situação de pânico como promotora do estresse oxidativo. O grupo controle (C) permaneceu alocado normalmente em gaiola.

Após os animais terem sido submetidos a situação de pânico, procedeu-se à eutanásia com guilhotina e foi realizada a remoção e homogeneização do córtex cerebral.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA)

A determinação da peroxidação lipídica foi realizada de acordo com o método descrito por Esterbauer & Cheeseman (1990), que se baseia na determinação do malonaldeído (MDA) devido a sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). O malonaldeído é O córtex foi homogeneizado com solução de KCl 1,15 % na proporção 1:10. O valor de TBA foi quantificado em nmol de malonaldeído por grama de proteína (nmol malonaldeído/mg proteína).

Atividade de superóxido dismutase (SOD)

Para a determinação da atividade enzimática específica da superóxido dismutase (SOD) foi utilizado o Kit Enzimático Ransod Cal (Randox Laboratories, Reino Unido), que utiliza a enzima xantina oxidase para a produção do radical superóxido. O córtex foi homogeneizado com tampão fosfato de potássio 50 mM + EDTA 1 mM pH 7,4, na proporção 1:10. O método baseia-se no uso de xantina oxidase (XOD) para gerar radicais superóxido que reagem com 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenol)-5-cloretos feniltetrazol (INT), que forma um composto de coloração vermelha, o formazan. Os resultados foram

expressos em U SOD/mg proteína (atividade específica). Uma unidade da SOD corresponde à quantidade de enzima capaz de inibir em 50 % a redução do INT.

Atividade de catalase (CAT)

A atividade da enzima catalase (CAT) foi quantificada segundo o método de Aebi (1984) o qual se baseia no acompanhamento da decomposição do H₂O₂ durante 5 minutos. O córtex foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio 10 mM pH 7,0, na proporção 1:10. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como 1 μmol de peróxido de hidrogênio consumido por minuto, e a atividade específica foi definida como unidades/mg de proteína.

Quantificação de proteínas

A concentração de proteína em mg da solução foi determinada pelo método descrito por Lowry *et al.* (1951) utilizando albumina bovina como padrão.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados por análise de variância ANOVA, e teste de Tukey a 5% de significância ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO

Tabela 1 Valores de TBA do córtex de ratos submetidos a administração de glutamato monossódico como promotor de estresse oxidativo e *Spirulina* como agente antioxidante

TRATAMENTOS	TBA (nmol malonaldeído/mg de proteína)
Controle (C)	6,25±0,89 ^a
Controle + glutamato (CG)	10,11±0,94 ^b
<i>Spirulina</i> comercial + glutamato (SC)	6,96±0,60 ^a
<i>Spirulina</i> LEB-18 + glutamato (SLEB18)	6,59±0,77 ^a

* Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

Os valores de TBA do córtex cerebral de ratos tratados com glutamato monossódico e *Spirulina* (Tabela 1) apresentaram diferença significativa entre si ($p=0,0003$). Os grupos controle (C), *Spirulina* comercial + glutamato (SC) e *Spirulina* LEB-18 + glutamato (SLEB-18) apresentaram valores de TBA que não diferiram entre si ($p>0,05$). O grupo Controle + glutamato (CG) apresentou resultado de TBA significativamente superior quando comparados aos demais tratamentos, indicando que o glutamato monossódico promoveu a peroxidação lipídica no córtex dos ratos e confirmando sua capacidade como promotor do estresse oxidativo. Por outro lado, os grupos que receberam glutamato monossódico concomitante com o tratamento prévio de *Spirulina* (comercial e LEB-18) apresentaram valores de TBA iguais e que não diferiram do controle que não recebeu nenhum tratamento estressor ou antioxidante. Este resultado sugere uma ação protetora da suspensão de *Spirulina* em córtex de ratos, uma vez que a lipoperoxidação, segundo Halliwell (1996) é considerada um dos mecanismos básicos de danos teciduais mediada por espécies reativas de oxigênio (ERO).

Na Tabela 2 estão elencados os resultados de SOD (superóxido dismutase) e CAT (catalase) para os diferentes tratamentos. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão.

Tabela 2 Atividade específica da superóxido dismutase (SOD) e da catalase (CAT) em córtex de ratos submetidos a administração de glutamato monossódico como promotor de estresse oxidativo e *Spirulina* como agente antioxidante

TRATAMENTOS	SOD (U/mg proteína)	CAT (micromoles/min/mg proteína)
Controle (C)	12,29 \pm 2,55 ^a	1,25 \pm 0,22 ^a
Controle + glutamato (CG)	1,24 \pm 0,26 ^b	0,60 \pm 0,17 ^b
<i>Spirulina</i> comercial + glutamato (SC)	11,50 \pm 3,35 ^a	1,13 \pm 0,11 ^a
<i>Spirulina</i> LEB-18 + Glutamato (SLEB18)	12,13 \pm 3,18 ^a	1,23 \pm 0,09 ^a

*Letras diferentes nas colunas representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p\leq 0,05$.

A análise de variância (ANOVA) dos resultados demonstrou diferença significativa entre os grupos de tratamento, tanto para a enzima SOD ($p=0,003$), quanto para a enzima CAT ($p=0,004$).

O grupo controle + glutamato (CG) apresentou atividade de SOD e CAT inferiores em relação aos demais grupos. Já os grupos tratados com glutamato monossódico e *Spirulina* Comercial ou *Spirulina* LEB-18 apresentaram valores de SOD e CAT estatisticamente iguais ao grupo controle.

Estes resultados indicam que quando foi adicionado o agente estressor (glutamato monossódico) ocorreu uma queda significativa na atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, porém quando o agente estressor foi adicionado aos grupos que receberam o pré-tratamento com *Spirulina* como agente antioxidante, observou-se que a atividade das enzimas SOD e CAT apresentou-se igual ao grupo controle, que recebeu apenas solução salina.

Resultados semelhantes foram descritos por Farombi e Onyema (2006), que concluíram que a administração de glutamato monossódico na dose 4 mg/g de peso corpóreo aumentou o índice de TBA e diminuiu a atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase no cérebro de ratos, porém a administração de vitamina C, vitamina E e quercetina atenuou a toxicidade gerada pela administração do glutamato monossódico.

Os danos provocados pela administração de glutamato monossódico podem ser explicados devido ao tecido cerebral ser altamente suscetível ao estresse oxidativo por apresentar um elevado consumo de oxigênio, presença de altos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e baixas defesas antioxidantes cerebrais comparadas a outros tecidos (HALLIWELL, 2006; BEHL, 2005; ZARKOVIC, 2003; FLOYD, 1999; HALLIWELL, 1996), fatos que o tornam mais vulnerável as espécies reativas.

Os resultados deste estudo, empregando glutamato monossódico como agente estressor e *Spirulina* como agente antioxidante, corroboram com descritos por Bavaresco *et al.* (2008) que utilizaram hipoxantina como agente estressor e as vitaminas C e E como antioxidante. Os autores verificaram que a administração do agente estressor provocou aumento da lipoperoxidação (TBA) em 32 % e diminuição da atividade das enzimas SOD e CAT em 31% e 43 %, respectivamente. Porém o pré-tratamento com vitamina C e E (antioxidantes) foi capaz de reverter as alterações mantendo os parâmetros iguais ao grupo controle.

A capacidade antioxidante da *Spirulina* neste estudo confirmam os descritos por diversos autores. Chamorro *et al.* (1996) relataram a possível utilidade terapêutica da *Spirulina* devido a sua ação como antioxidante. A atividade antioxidante da *Spirulina* e de compostos extraídos da mesma foi relatada por Colla *et al.* (2007a) quando demonstraram o efeito antioxidante *in vitro* de extratos fenólicos da *Spirulina platensis*, cultivada sob diferentes condições, na inibição do escurecimento enzimático ocasionado pela peroxidase. Miranda *et al.* (1998) também verificaram a capacidade antioxidante da *Spirulina* em ratos.

ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR SITUAÇÃO DE PÂNICO

Tabela 3 Valores de TBA do córtex de ratos submetidos ao pânico e administração de *Spirulina*

TRATAMENTOS	TBA (nmol malonaldeído/mg proteína)
Controle (C)	5,23±0,50 ^a
Controle + pânico (CP)	6,80±0,70 ^b
Spirulina + pânico (SP)	4,90±0,31 ^a

* Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

A análise de variância dos resultados mostrou que houve diferença significativa ($p = 0,006$) entre os tratamentos. O grupo que recebeu solução salina durante os 8 dias de tratamento e foi submetido a condição de pânico, grupo CP, apresentou valores de TBA significativamente superiores aos demais grupos, demonstrando que o pânico promoveu o estresse oxidativo e conseqüentemente a lipoperoxidação no córtex cerebral dos ratos. O grupo controle (C), que recebeu solução salina e não foi submetido ao pânico apresentou valores de TBA estatisticamente iguais aos valores encontrados para o grupo que foi submetido ao pânico, porém recebeu suspensão de *Spirulina* (SP). Isso demonstrou que a *Spirulina* foi capaz de atenuar os danos causados pelo estresse oxidativo gerado por situação de pânico. Quando comparamos os dois grupos submetidos às mesmas condições estressoras, verificou-se que o grupo que recebeu a biomassa de *Spirulina* manteve os valores de TBA iguais ao grupo controle, enquanto o grupo que recebeu solução salina apresentou um aumento significativo.

O aumento no valor de TBA pode ser explicado pelo fato do estresse por pânico gerar excesso da formação das espécies reativas, principalmente do radical hidroxil, podendo iniciar o processo de oxidação de lipídios das membranas celulares, formando peróxidos, além de reagir de forma não seletiva com os outros constituintes celulares. A oxidação de ácidos graxos insaturados da membrana celular é o evento oxidativo que ocorre com maior freqüência no organismo (JORGE e RAMALHO, 2005; CINTRA e MANCINE FILHO, 1998).

A SOD e a CAT são as duas maiores enzimas antioxidantes que removem os radicais livres *in vivo* (ANNIDA e STANELY, 2005) por isso são importantes indicadores de estresse oxidativo. As Tabelas 4 e 5 apresentam os valores das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), respectivamente.

Tabela 4 Atividade específica da enzima superóxido dismutase em córtex de ratos submetidos a estresse oxidativo e com administração de *Spirulina*

TRATAMENTOS	SOD (U/mg proteína)
Controle (C)	12,29±2,55 ^a
Controle + pânico (CP)	21,42±0,62 ^b
Spirulina + pânico (SP)	13,91±1,95 ^a

* Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

Os resultados de SOD foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e apresentaram diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,009$). Observa-se que o estresse provocado por pânico promoveu um aumento significativo na atividade de SOD quando comparado com os demais grupos. Os grupos controle (C) e *Spirulina* + pânico (SP) são estatisticamente iguais quanto aos valores de SOD. Isso demonstra que a *Spirulina* é capaz de manter os padrões enzimáticos de SOD encontrados no controle, mesmo após o procedimento de pânico.

Tabela 5 Atividade específica da enzima catalase em córtex de ratos submetidos a estresse nervoso e com administração de *Spirulina*

TRATAMENTOS	CAT (micromoles/min/mg proteína)
Controle (C)	2,04±0,18 ^a
Controle + pânico (CP)	0,82±0,25 ^b
Spirulina + pânico (SP)	2,07±0,42 ^a

* Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

De acordo com a análise de variância (ANOVA) existe diferença significativa entre os tratamentos ($p = 0,003$). O grupo submetido ao pânico sem ingestão de *Spirulina* apresentou atividade da CAT significativamente inferior. Enquanto os grupos controle e *Spirulina* + pânico não diferiram entre si. Dessa forma, evidencia-se que a *Spirulina* conseguiu manter a atividade da CAT igual ao grupo controle, mesmo após o procedimento de pânico (grupo SP). Já o grupo controle + pânico (CP) apresentou um decréscimo significativo na atividade da CAT.

Os resultados de aumento da lipoperoxidação, decréscimo na atividade da enzima CAT e aumento da atividade da enzima SOD no córtex dos ratos submetidos ao agente estressor (pânico), estão de acordo com os encontrados por Brasil *et al.* (2007) em fígado de ratos submetidos à exposição ao agente estressor halonato em hipóxia. O aumento da SOD pode ser explicado em função do aumento adaptativo devido a elevada produção do íon superóxido, potente radical livre.

O estresse oxidativo gerado é explicado pela situação de pânico aos quais os animais foram submetidos. Após dez minutos de uma carga excessiva de noradrenalina, adrenalina e dopamina, que são os neurotransmissores liberados no estresse, o cérebro é

invadido pelos hormônios corticóides. Estes, embora muito importantes para nos manter sempre bem dispostos, são extremamente prejudiciais ao cérebro quando em excesso. O excesso de corticóide gera também uma produção exagerada e perigosa de radicais livres no cérebro, que vai gerar uma série de problemas. O cérebro sadio requer o estresse balanceado, que é uma faixa segura entre o excesso de radicais livres e a falta deles. Quando o cérebro entra em sofrimento, devido ao estresse, ocorre o chamado estresse oxidativo, que equivale a uma tempestade neurobioelétrica, de sérias conseqüências (PÓVOA *et al.*, 2005).

A neuroproteção apresentada pela *Spirulina* neste trabalho reforça a idéia de que o extrato da microalga, bem como alguns de seus constituintes, apresentam elevada capacidade antioxidante, pois exercem atividade inibidora da peroxidação lipídica e provocam a eliminação de radicais livres (radicais hidroxil e peroxil) pelo sistema enzimático (BERMEJO *et al.*, 2008; RISS *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2005; UPASANI e BALARAMAN, 2003; BHAT e MADYASTHA, 2000).

Os resultados encontrados neste trabalho, de proteção antioxidante da *Spirulina* corroboram com Wu *et al.* (2005) que utilizaram o extrato aquoso de *Spirulina* e verificaram significativa atuação antioxidante em células hepáticas estreladas e células tumorais hepáticas. Chamorro *et al.* (1996) relataram que além do elevado valor nutritivo, a *Spirulina* tem mostrado diversos efeitos biológicos, de possível utilidade terapêutica, dentre eles a capacidade antioxidante. Os compostos fenólicos existentes na *Spirulina* são ácidos orgânicos como os ácidos caféico, clorogênico, salicílico, sináptico e trans-cinâmico, os quais agem individualmente ou sinergicamente como compostos antioxidantes em sistemas *in vivo* e *in vitro* (ESTRADA *et al.*, 2001; MIRANDA *et al.*, 1998).

A *Spirulina* é legalmente autorizada como complemento alimentar na Europa, Japão e Estados Unidos pelo FDA (Food and Drug Administration), sem efeitos tóxicos ao organismo (VON DER WEID *et al.*, 2000; BELAY *et al.*, 1993). No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) reconhece a *Spirulina* como um alimento e permite a comercialização de produtos no qual a microalga tenha sido adicionada, desde que o mesmo esteja devidamente registrado (BRASIL, 2008). Com base nos dados científicos já existentes, e considerando os resultados apresentados neste trabalho, pode-se incrementar a caracterização da microalga *Spirulina* como um alimento funcional antioxidante.

CONCLUSÕES

O tratamento com as microalgas *Spirulina* LEB-18 e *Spirulina* comercial em ratos submetidos à indução de estresse oxidativo com glutamato monossódico, manteve os valores de TBA estatisticamente iguais ao grupo controle.

As atividades das enzimas SOD e CAT dos grupos tratados com as microalgas *Spirulina* LEB-18 e *Spirulina* comercial não apresentaram diferença significativa em relação ao controle.

Os danos provocados pelo glutamato monossódico em córtex de ratos foram atenuados pela adição da microalga *Spirulina*.

O valor de TBA do tratamento com *Spirulina* nos animais submetidos à indução de estresse oxidativo por situação de pânico foi mantido estatisticamente igual ao tratamento controle.

As atividades das enzimas SOD e CAT para os tratamentos com *Spirulina* não diferiram do grupo controle.

A *Spirulina* mostrou capacidade antioxidante, inibindo e/ou atenuando a ação lesiva que os radicais livres provocaram no córtex cerebral de ratos induzidos ao estresse oxidativo por glutamato monossódico ou por situação de pânico, caracterizando-a no âmbito dos alimentos funcionais antioxidantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** 105, 121-126. 1994.

ANNIDA, B.; STANELY, P.M.P. Supplementation of Fenugreek Leaves Reduces Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **J. Medicin. Food.** 8, 382-385. 2005.

AMBROSI, M. A.; REINEHR, C. O.; BERTOLIN, T. E.; COSTA J. A. V.; COLLA L. M. Propriedades de saúde da microalga *Spirulina*. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** 29, 115-123. 2008.

ANSARI, M.A; ROBERTS, K.N.; SCHEFF, S.W.; Oxidative stress and modifications of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. **Free Radical Biol. Med.** 2008.

BARBOSA, L.F.; MEDEIROS, M.H.G.; OHARA A.; Danos oxidativos e neurodegeneração: O que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Quim. Nova**, Vol. 29, No. 6, 1352-1360, 2006.

BAVARESCO, C.S.; CHIARANI, F.; KOLLING, J.; NETTO, C.A.; WYSE, A.T.S Biochemical effects of pretreatment with vitamins E and C in rats submitted to intrastriatal hypoxanthine administration. **Neurochem. Intern.** 2008.

BECKMAN, K.B.; AMES, B. N. The free theory of aging matures. **Physiol. Rev.** 78, 547-581. 1998.

BEHL, P.; STEFURAK, T.L., BLACK, S.E. Progress in clinical neurosciences: cognitive markers of progression in Alzheimer's disease. **Canadian J. Neurol. Sci.** 32, 40 – 151. 2005.

BELAY, A.; OTA, Y.; MIYAKAWA, K.; SHIMAMATSU, H. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. **J. Appl. Phycol.** 5, 235-41. 1993.

BERMEJO, P.; PINERO, E.; VILLAR, A.M. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. **Food Chem.** 110, 436–445. 2008.

BHAT, V.B.; MADYASTHA, K.M. C-phycocyanin: a potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 275, 20–25. 2000.

BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse Medicale** 31, 1174-1184, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **VII Lista dos novos ingredientes aprovados – Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos**. Disponível em URL: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm. 2009.

BRASIL, L.J.; AMARAL, J.L.G.; ZETTLER, C.G.; MARRONI, C.A.; VERCELINO, R.; MARRONI, C.A. Experimental model of liver oxidative damage induction in rats by halothane. **Arq Gastroenterol.** 4, 73-77. 2007.

CHAMORRO, G.; SALAZAR, M.; FAVILA, R.; BOURGES, H. **Rev. Invest. Clin.** 48, 389-399. 1996.

CHEESEMAN, K.H.; SALTER, T.F. Uma introdução a bioquímica dos radicais livres. **Radicais Livres Med.** 1996.

CHOW, C.S. Vitamin E and oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.** 11, 215- 232, 1991.

CINTRA, M.G.C.; MANCINE FILHO, J. Antioxidantes naturais presentes nos alimentos e a prevenção das doenças cradiovasculares. **Boletim SBCTA.** 32, 72-79. 1998.

COLLA, L.M.; FURLONG, E.B.; COSTA, J.A.V. Antioxidant Properties of *Spirulina* (Arthospira) platensis Cultivated Under Different Temperatures and Nitrogen Regimes. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 50, 161-7; 2007a.

DINIZ, Y.S.et al. Toxicity of hipercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. **Food Chemical Toxicol.**42, 313-319. 2004.

DUMONT, E.; PETIT, E.; NOUVELOT, A.; TARRADE, A. Free radicals, lipids and protein degradation. **Free Radic. Biol. Med.** 13, 197-198. 1992.

EATON, J.W. Catalase and peroxidases and glutathionea and hydrogen peroxide: Mysteries of the bestiary. **J. Lab. Clin. Med.** 7, 3-4. 1991.

ESTERBAUER, H. & CHEESEMAN, K., Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynoneal. **Method. Enzymol.** 186, 407-408. 1990.

ESTRADA, J.E.; BESCÓS, P.; VILLAR DEL FRESNO, A.M. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **II Farmaco** 56, 497-500. 2001.

FAROMBI E. O., ONYEMA O.O., Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. **Hum Exp Toxicol.** 25, 251-9. 2006.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Brasil.** 43, 61-68. 1997.

FLOYD, R.A. Antioxidants, oxidative stress and degenerative neurological disorders. **Proceed. Soc. Experim. Biol. Med.** 222, 236-245. 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals Biol. Med.**. Nova York: Oxford University Press, 1, 2007.

HALLIWELL, B.; Oxidative stress and neurodegenerative: where are we now. **J. Neurochem.** 97, 1634-1658. 2006.

HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **Brit J Nutr.** 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C. **Free Radicals Biol. Med.** 3.ed. Oxford, New York, 2000.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radicals Biol. Med.** 3rd ed. New York: Oxford, 1999.

HALLIWELL, B.; Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. **Biochem. Soc. Transactions.** 24, 1023-1027. 1996.

HASLER, C. M. Functional foods: their role in disease in: developing new food products for a changing prevention and health promotion. **Food Technol.** 52, 57-62. 1998.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutrit. Biochem.** 13, 572-584. 2002.

HENRIKSON, R. **Microalga *Spirulina* – Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN 84-7953-047-2. 1994.

HENRIQUES, J.A.P.; DAFRÉ, A.L.; PICADA, J.N.; MARIS, A.F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: NATALI, M. R. M.; SOARES, ^a; SCHOFFEN, J. P. F. E GOUVEIA, E. M. D. **Efeitos do tratamento com glutamato monossódico nos neurônios do plexo mioentérico do íleo de ratos (*Rattus norvegicus*)**. Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR – Brasil. 2001.

HERMES-LIMA, M.; STOREY, K.B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails. **Comparat. Biochem. Physiol.** 120 B, 437-448. 1998.

HUNGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opin. in Biotechnol.** 13, 497-507. 2002.

INOUE, M. Protective mechanism against reactive oxygen species. In: ***The Liver Biology and Pathobiology***. Ed. I. M. Arias, J. L. Boyer, N. Fausto, W. B. Jacoby, D. A. Schachter and D.A. Shafritz. Raven Press. 443-460. 1994.

JACOB, R.A.; BURRI, B. Oxidative damage and defenses. **Am. J. Clin. Nutr.** 63, 985-990. 1996.

JORGE, N.; RAMALHO, V.C. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quím. Nova.**1. 2005.

KALANTZOPOULOS, G. Fermented products with probiotic qualities. **Anaerobe.** 3, 185-190. 1997.

KATO, T.; TAKEMOTO, K.; KATAYAMA, H.; KUWABARA, Y. Effects of *Spirulina platensis* on dietary hypercholesterolemia in rats. **J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.** 37:323-32. 1984

KITTS, D.D. Bioactive substance in food: identification and potential use. **Canada J. Physiol. Pharmacol.** 72, 423-434. 1994.

KOUTSILIERI, E., SCHELLER, C., TRIBL, F., RIEDERER, P. Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress – microglial contribution. **Parkinsonism and Related Disorders.** 8:401-406. 2002.

KRUGER, C. L.; MANN, S. W. Safety evaluation of functional ingredients. **Food and Chemical Toxicology.** 41, 793-805. 2003.

LEBOVITZ, R.M.; ZHANG, H.; VOGEL, H.; CARTWRIGHT, J. Jr.; DIONNE, L.; LU, L.; HUANG, S.; MATZUK, M.M. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93, 9782-9787. 1996.

LEVINE, R. L.; BERLLET, B. S.; MOSKOSVITZ, J.; MOSONI, L.; STADTMAN, E.R. Methionine residues may protect protein from critical oxidative damage. **Mech. Ageing Dev.**, 107, 323-332. 1999.

LI, Y.; HUANG, T.T.; CARLSON, E.J.; MELOV, S.; URSELL, P.C.; OLSON, J.L.; NOBLE, L.J.; YOSHIMURA, M.P.; BERGER, C.; CHAN, P.H.; WALLACE, D.C.; EPSTEIN, C.J. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nat. Genet.** 11, 376-381. 1995.

LOSEVA, L.P.; DARDYNSKAYA, I.V. *Spirulina*: a natural sorbent of radionuclides. Research Institute of Radiation Medicine, Minsk, Belarus. 6th. **Intern. Congr. of App. Algology.** Czech Republic, Belarus, 1993.

LOWRY, H.O.; ROSENBOUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265-275, 1951.

MEERSON, F.Z.; KAGAN, V.E.; KOSLOV, Y.P.; BELKINA, L.M.; ARKIPENKO, Y.V. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of damage and antioxidant protection of the heart. **Basic. Res. Cardiol.** 77, 465-485. 1982.

MELLO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA.** 36, 1-11. 2002.

MELOV, S.; COSKUN, P.; PATEL, M.; TUINSTRA, R.; COTTRELL, B.; JUN, A.S.; ZASTAWNY, T.H.; DIZDAROGLU, M.; GOODMAN, S.I.; HUANG, T.T.; MIZIORKO, H.; EPSTEIN, C.J.; WALLACE, D.C. Mitochondrial disease in superoxide dismutase 2 mutant mice. **Proc. Natl. Acad.Sci.** 96, 846-851. 1999.

MIRANDA, M.S.; CINTRA, R.G.; BARROS, S.B.; MANCINI, F.J. Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima* . **Braz. J. Med. Biol. Res.**31, 1075-1079. 1998.

MORA, A.; PAYA, M.; RIOS, J.L.; ALCARAZ, M.J. Structure-activity relationships of polymethoxyflavones and other flavonoids as inhibitors of non-enzymic lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.** 40, 793-797. 1990.

MOREIRA, A.V.; et al. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Rev. Nutrition.** 17, 411-424. 2004.

NEUMANN, P., et al. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimentos, nutracêuticos....você já ouviu falar? **Higiene Alimentar.** 14, 19-23. 2002.

NOONAN, W. P.; NOONAN, C. Legal requirements for “functional foods” claims. **Toxicology Letters.** 150, 19-24. 2004.

NAKAYA, N.; HOMMA, Y.; GOTO, Y. Cholesterol lowering effect of *Spirulina*. **Nutritional Rep. Intern.** 37: 1329-37. 1998.

PAWLAK, W.; KEDZIORA, J.; ZOLYNSKI, K.; KEDZIORA-KOMATOWSKA, K.; LASZAZYK, J.; WITKOWSKI, P.; ZICLENIEWSKI, J. Effect of long term bed rest in man on enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation in erythrocytes. **J. Gravitat. Physiol.**163-164. 1998.

PÉREZ, L.V.; ABRAHAM, C.M.; LEYVA, I.T.; FERRER, B.B.S.; SUÁREZ, V.M.; SEGURA, M.S. Efecto in vitro de la *Spirulina* sobre la respuesta inmune. **Rev. Cubana Hematol. Inmunol. Hemoter.** 18(2). 2002.

PETER, B. *et al.* Role of lipid peroxidation and DNA damage in paraquat toxicity and the interaction of paraquat with ionizing radiation. **Biochem. Pharmacol.**, 43, 705-715. 1992.

PIMENTEL, B. M. V.; FRANCKI, M.; GOLLÜCKE, B. P. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos.** São Paulo: Editora Varela, 2005.

PÓVOA, H.; CALLEGARO, J.; AYER, L. **Nutrição cerebral.** Objetiva. Rio de Janeiro. 2005.

PREMKUMAR, K.; PACHIAPPAN, A.; ABRAHAM, S.K.; SANTHIYA, S.T.; GOPINATH, P.M.; RAMESH, A. Effect of *Spirulina fusiformis* on cyclophosphamide and mitomycin-C induced genotoxicity and oxidative stress in mice. **Fitoter.** 72, 906-911. 2001.

RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture.** Boston: CRC Press; 1990.

RISS, J.; DECORDE, K.; SUTRA, T.; DELAGE, M.; BACCOU, J.C.; JOUY, N.; BRUNE, J.P.; OREAL, H.; CRISTOL, J.P.; ROUANET, J.M. Phycobiliprotein C-phycoyanin from *Spirulina platensis* is powerfully responsible for reducing oxidative stress and NADPH oxidase expression induced by an atherogenic diet in hamsters. **J. Agric. Food Chem.** 55, 7962–7967. 2007.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease.** 34,105-10. 2002.

ROMANO, I.; BELLITTI, R.; NICOLAUS, B.; LICIA LAMA, M.; MANCA, M.C.; PAGNOTTA, E.; GAMBACORTA, A. Lipid profile: a chemotaxonomic marker for classification of a new cyanobacterium in *Spirulina* genus. **Phytochemistry.** 54, 289-294. 2000.

SAGARA, Y., DARGUSCH, R., CHAMBERS, D., DAVIS, J., SCHUBERT, D., MAHER, P. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radical Biol. Med.** 24, 1375-1389. 1998.

SALGADO, J. **Antioxidantes X Radicais Livres**. Disponível em: **Erro! A referência de hyperlink não é válida.**..aspx?texto.aspx?idContent=529&idContentSection=290.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. 1a Ed. Editora da ULBRA, Canoas, 2004.

SCHWARTZ J, SHKLAR G, SUDA D. Inhibition of experimental oral carcinogenesis by topical beta carotene. **Carcinogenesis**. 7:711-5. 1986.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. **Biotechnologia na Agricultura e na Agroindústria**. Guaíba: Agropecuária, 1, 227-252. 2001.

SGARBI, L., disponível em: <http://www.terra.com.br/istoe/>, 2007.

SIES, H. Strategies of antioxidant defense. **Europ.J. Biochem.** 215, 213-219. 1993.

SIPES, I.G.; BROWN, B.R.JR. An animal model of hepatotoxicity associated with halothane anesthesia. **Anesthesiol.** 45, 622-628. 1976.

SMITH, P.; HEATH, D. Paraquat. **CRC Crit. Rev. Toxicol.** 4, 411-45. 1976.

SOARES, D. G. **Avaliação da Capacidade Antioxidante do Butil hidroxitolueno, Propil galato, Resveratrol, Vitamina C e Vitamina E em Sistemas Biológicos e Químicos**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) Universidade de Caxias do Sul – Inst. de Biotec. 2001.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH, and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **J. Agric. Food Chem.** 51, 1077-1080. 2003.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. Nature and biologic reactions. **Mayo Clennic Proceeding**. 63, 381-389. 1998.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**. 37, 127-135. 2003.

TAIPINA, M. S.; FONTS, M. A. S.; COHEN, V. H. Alimentos funcionais – nutracêuticos. **Hig. Alimentar**.16, 28-29. 2002.

TAKABE, W.; NIKI, E.; UCHIDA, K.; YAMADA, S.; SATOH, K.; NOGUCHI, N. Oxidative stress promotes the development of transformation: involvement of a potent mutagenic lipid per oxidation product, acrolein. **Carcinogen**. 22, 935-941. 2001.

TAYLOR, C. G.; BRAY, T. M. Effect of hiperoxia on oxigen free radical defense enzymes in lung of zinc deficient rats. **J. Nutr**. 121, 460-466. 1991.

UPASANI, C.D.; KHERA, A.; BALARAMAN, R. Effect of lead with vitamin E, C, or *Spirulina* on malondialdehyde, conjugated dienes and hydroperoxides in rats. **Indian J. Exp. Biol**. 39, 70-74. 2001.

UPASANI, C.D.; BALARAMAN, R. Protective effect of *Spirulina* on lead induced deleterious changes in the lipid peroxidation and endogenous antioxidants in rats. **Phytother. Res**. 17, 330–334. 2003.

URSO, M. L., CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology**. 189, 41-54. 2003.

VON DER WEID, D.; DILLON, J.C.; FALQUET, J. Malnutrition: a silent massacre. **Antenna Technology**. 2000.

VONSHAK, A. ***Spirulina platensis* (Arthospira): Physiology, cell biology and biotechnology**. Taylor & Francis, London.1997.

ZWART, L. L.; MEERMAN, J. H. N.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biol. Med.** 26, 202-226. 1999.

WALZEM, R. L. Functional Foods. **Trends in Food Sci. and Technol.** 15, p. 518, 2004.

WANG, M.; JIN, Y.; HO, C.T. Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2,2 diphenyl 1- picrylhydrazyl radical. **J. Agric. Food Chem.** 47, 3947-3977. 1999.

WARD, R.J.; PETRES, T.J. Free radicals. In: MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K. **Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects.** New York: Churchill Livingstone. 765-777. 1995.

WU, L.C.; HO, J.A.; SHIEH, M.C.; LU, I.W. Antioxidant and antiproliferative activities of Spirulina and Chlorella water extracts. **J. Agric. Food Chem.** 53, 4207–4212. 2005.

EFEITO NEUROPROTETOR DA FICOCIANINA EM RATOS

GUARIENTI, Cíntia; BERTOLIN, Telma Elita; COSTA, Jorge Alberto Vieira

EFEITO NEUROPROTETOR DA FICOCIANINA EM RATOS

RESUMO

O cérebro é muito susceptível a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), pois apresenta um elevado conteúdo lipídico, baixos níveis de enzimas antioxidantes e elevado consumo de oxigênio. O organismo apresenta defesas antioxidantes para evitar o acúmulo excessivo ERO, porém a ingestão de antioxidantes exógenos pode contribuir com estas defesas. A ficocianina, pigmento da microalga *Spirulina*, é o principal componente responsável pela capacidade antioxidante desta microalga. O objetivo do presente artigo foi avaliar a capacidade antioxidante da ficocianina, através da análise de lipoperoxidação e da atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase em córtex de ratos tratados com glutamato monossódico via intraperitonal e ficocianina via gavagem, por um período de 8 dias. Os resultados mostram que houve aumento na lipoperoxidação e diminuição na atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no córtex dos animais tratados com o agente estressor. Os animais tratados com glutamato monossódico e ficocianina apresentaram índices de TBA ($6,90 \pm 1,22$; $6,76 \pm 0,52$ e $5,46 \pm 1,08$ nmol malonaldeído/mg de proteína, para 1; 3 e 5 mg/d, respectivamente), SOD ($7,43 \pm 1,15$; $7,86 \pm 1,84$ e $9,36 \pm 3,75$ U/mg proteína, para as concentrações 1; 3 e 5 mg/d, respectivamente) e CAT ($1,48 \pm 0,36$; $1,45 \pm 0,28$ e $1,60 \pm 0,07$ micromoles/min/mg proteína, utilizando 1; 3 e 5 mg/d, respectivamente) comparáveis aos do controle ($5,11 \pm 1,14$ nmol malonaldeído/mg de proteína para TBA; $10,23 \pm 2,50$ U/mg proteína para SOD e $1,50 \pm 0,32$ micromoles/min/mg proteína para CAT), demonstrando a ação antioxidante da ficocianina frente ao estresse oxidativo provocado por glutamato monossódico em córtex de ratos.

Palavras-chave: antioxidante; córtex; ficocianina; radicais livres.

INTRODUÇÃO

O aumento nas pesquisas em busca de alimentos contendo substâncias biologicamente ativas são relatadas por diferentes pesquisadores nas últimas décadas. (MELLO e GUERRA, 2002; KROON e WILLIAMSON, 1999; PARK *et al.*, 1997). Neste contexto, inserem-se os antioxidantes, visto que podem retardar o dano oxidativo de

tecidos aumentando suas defesas naturais (WILLIAMS e CHUNG, 2006; TSUDA *et al.*, 1998).

Os radicais livres são produtos naturais do metabolismo humano, onde a partir dos nutrientes e do oxigênio que respiramos, acontece uma série de reações químicas dentro das células que têm como produto a formação de energia e de água. A redução da molécula de O₂ até H₂O gera espécies reativas, radicais livres, os quais possuem um elétron desemparelhado e tem um papel importante no organismo humano, devendo ser produzidos em quantidades controladas. Quando a produção dessas substâncias se torna incontrolável, surgem diferentes manifestações patológicas do tipo degenerativas. Estas manifestações geram doenças como câncer, Alzheimer, Parkinson, entre outras, e é onde está embasada a teoria mais aceita na atualidade para explicar o processo do envelhecimento humano, Teoria do Estresse Oxidativo. (AFANAS'EV, 2005; ASKOT e ALLI, 1999). Algumas substâncias podem atuar como indutoras de estresse oxidativo, dentre estas se encontra o monoglutamato de sódio ou glutamato monossódico. Esta substância é utilizada na indústria de alimentos como realçador de sabor, e é também um neurotransmissor. O excesso de monoglutamato no cérebro permite demasiada afluência de cálcio para dentro da célula neuronal, propiciando a formação de radicais livres (RL) com morte celular (HENRIQUES *et al.*, 2001).

O estresse oxidativo tem seus danos minimizados pelo sistema de defesa antioxidante enzimático, representado pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona-peroxidase (GPx) e glutaciona-redutase (GR) (BONNEFOY *et al.*, 2002). O organismo tem a capacidade de produzir compostos que apresentam grande capacidade de defesa antioxidante, direta ou indireta, atuando a fim de manter o estado de equilíbrio celular (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Além das defesas antioxidantes enzimáticas, os antioxidantes não enzimáticos presentes nos alimentos também são importantes, visto que as defesas antioxidantes enzimáticas podem ser insuficientes para sanar o dano oxidativo. Entre os antioxidantes não enzimáticos, podem-se citar as vitaminas, os compostos polifenólicos e os de baixo peso molecular.

A ficocianina é um pigmento fotossintético da família das ficobiliproteínas. Entre as cianobactérias, as espécies do gênero *Spirulina* são uma fonte rica e barata desse pigmento (RICHMOND, 1986). A ficocianina é usada como corante alimentício (YOSHIDA *et al.*, 1996) e também em cosméticos (COHEN, 1986). Esse pigmento é relatado como um agente com potencial terapêutico em doenças induzidas pelo estresse oxidativo,

devido a apresentar capacidade antioxidante (BHAT e MADYASTHA, 2001; RIMBAU *et al.*, 1999; ROMAY *et al.*, 1998).

De acordo com o exposto, o objetivo desse trabalho foi verificar o efeito antioxidante da ficocianina em córtex de ratos submetidos a estresse oxidativo promovido por monoglutamato de sódio.

MATERIAL E MÉTODOS

ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os estudos foram realizados com 30 ratos machos adultos da raça Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), com dois a três meses de idade, pesando entre 270 g a 370 g. Os experimentos foram distribuídos em 5 grupos experimentais. Cada grupo composto por 6 animais, sendo alocados 3 animais em cada gaiola. Os animais receberam ração e água *ad libitum*. Os grupos experimentais foram divididos em grupo controle (C) que não recebeu solução de ficocianina e nem de glutamato monossódico; grupo controle + glutamato (CG), grupo F1: 1 mg/d de ficocianina + glutamato, grupo F3: 3 mg/d de ficocianina + glutamato e grupo F5: 5 mg/d de ficocianina + glutamato. A dose de monoglutamato de sódio administrada nos ratos foi de 4 mg/g corpóreo (Diniz *et al.*, 2004). A ficocianina foi extraída da microalga *Spirulina* LEB-18 de acordo com PI 0801702-6 (KALIL *et al.*, 2008).

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram submetidos aos tratamentos durante um período de 8 dias. Durante os 8 dias de tratamento os grupos ficocianina (F1, F3 e F5) receberam doses da solução aquosa de ficocianina por gavagem. Os grupos controle (C e CG) receberam solução salina 0,9 % (soro fisiológico), também por meio de gavagem, para promover as mesmas condições e/ou possíveis interferências em todos os grupos. No oitavo dia de tratamento, o monoglutamato de sódio foi administrado, como promotor do estresse oxidativo (FAROMBI e ONYEMA, 2006), nos ratos dos grupos CG, F1, F3 e F5 via intraperitonal. O grupo controle (C) foi tratado com solução salina 0,9 % via intraperitonal para homogeneizar as condutas realizadas nos animais em tratamento.

No oitavo dia, decorrida 1 h da aplicação do monoglutamato de sódio e da *Spirulina* os animais foram submetidos a eutanásia com guilhotina e foi realizada a remoção do córtex cerebral para análise. O córtex dos animais foi imediatamente removido e homogeneizado com solução de KCl 1,15 % na proporção 1:10.

ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Determinação das Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA)

As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico TBA foram quantificadas pelo método descrito por Esterbauer e Cheeseman (1990).

Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase foi quantificada através de kit enzimático Ransod Cal (Randox Laboratories, Reino Unido).

Determinação da atividade da enzima catalase

A quantificação da enzima catalase foi realizada segundo método descrito por Aebi (1984).

Quantificação de proteínas

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951), utilizando albumina bovina como padrão.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram avaliados por análise de variância ANOVA, e teste de Tukey a 5% de significância ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1 Valores de TBA do córtex de ratos submetidos a administração de ficocianina e glutamato monossódico

TRATAMENTOS	TBA (nmol malonaldeído/mg de proteína)
Controle (C)	5,11±1,14 ^a
Controle + glutamato (CG)	10,66±0,02 ^b
1 mg/d de ficocianina + glutamato (F1)	6,90±1,22 ^a
3 mg/d de ficocianina + glutamato (F3)	6,76±0,52 ^a
5 mg/d de ficocianina + glutamato (F5)	5,46±1,08 ^a

* Letras diferentes representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

Pela análise de variância o valor de TBA do grupo controle + glutamato (CG) foi estatisticamente superior aos demais tratamentos. Esse fato evidencia que o monoglutamato de sódio promoveu danos oxidativos aos lipídios no córtex cerebral de ratos. Os tratamentos controle (C), 1 mg/d de ficocianina + glutamato (F1), 3 mg/d de ficocianina + glutamato (F3) e 5 mg/d de ficocianina + glutamato (F5) apresentam valores de TBA iguais entre si, indicando que a ficocianina foi capaz de atenuar os efeitos citotóxicos do agente estressor glutamato monossódico.

O elevado valor de TBA, de $10,66 \pm 0,02$, no tratamento controle + glutamato (CG), pode ser explicado devido a presença de ácidos graxos insaturados nas membranas celulares, que oxidam facilmente pela ação dos radicais livres, ocasionando a peroxidação lipídica. Quando a permeabilidade da membrana celular é alterada, pode ocorrer morte celular e /ou oxidação de moléculas importantes, como proteínas e DNA (LEHNINGER *et al.*, 2000). O TBA indica a quantidade de formação de malonaldeído, ou seja, o aldeído individual mais abundante proveniente da peroxidação lipídica (ESTERBAUER e CHEESEMAN, 1990), e portanto permite avaliar o processo de lipoperoxidação provocado pelo estresse oxidativo.

A ficocianina é o principal pigmento da microalga *Spirulina* e constitui aproximadamente 20 % em peso seco da microalga. Quando ingerido atua como estimulante do sistema imunológico, aumentando a contagem de leucócitos, cuja função principal é manter a saúde dos órgãos do corpo humano (HENRIKSON, 1994). A capacidade antioxidante da ficocianina foi observada por diferentes pesquisadores. Colla *et al.* (2007) e Souza *et al.* (2006) verificaram que a ficocianina apresenta capacidade antioxidante nos sistemas lipídicos como óleo de soja e azeite de oliva, através da avaliação do índice de peróxidos. Estudos *in vivo*, demonstram sua capacidade

antioxidante, pois reage com substâncias reativas ao oxigênio geradas durante o processo oxidativo (ESTRADA *et al.*, 2001). A atividade antioxidante de extratos obtidos na purificação da ficocianina foi demonstrada por Estrada *et al.* (2001).

As enzimas SOD e CAT são enzimas antioxidantes importantes que removem os radicais livres *in vivo*. A SOD é uma proteína importante para o sistema de defesa antioxidante, convertendo superóxido em H_2O_2 (FREEMAN e CRAPO, 1982). A SOD pode ser rapidamente induzida em algumas condições quando as células ou organismos são expostos a estresse oxidativo (MICHIELS *et al.*, 1994). A enzima CAT tem como função principal a dismutação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formando água e oxigênio molecular (FRIDOVICH, 1998).

Tabela 2 Atividade específica das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em córtex de ratos tratados com glutamato monossódico e ficocianina

TRATAMENTOS	SOD (U/mg proteína)	CAT (micromoles/min/mg proteína)
Controle (C)	10,23±2,50 ^a	1,50±0,32 ^a
Controle + Glutamato (CG)	1,24±0,26 ^b	0,75±0,34 ^b
1 mg/d de ficocianina + glutamato (F1)	7,43±1,15 ^a	1,48±0,36 ^a
3 mg/d de ficocianina + glutamato (F3)	7,86±1,84 ^a	1,45±0,28 ^a
5 mg/d de ficocianina + glutamato (F5)	9,36±3,75 ^a	1,60±0,07 ^a

* Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa pelo teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

Pela análise de variância das atividades de SOD verifica-se que o tratamento controle + glutamato (CG) diferiu dos demais tratamentos apresentando atividade enzimática reduzida. Os grupos tratados com ficocianina (F1, F3 e F5) apresentaram-se iguais entre si e não diferiram do tratamento controle (C), mostrando que a ficocianina foi capaz de manter a atividade de SOD após a adição de glutamato monossódico.

Quando os resultados CAT foram submetidos à análise de variância verificou-se comportamento semelhante ao encontrado para a SOD, ocorrendo diminuição significativa da CAT no tratamento com glutamato monossódico e proteção aos efeitos deste estressor pela ficocianina.

Resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho foram verificados por Bavaresco *et al.* (2008), estudando os efeitos das vitaminas C e E na prevenção de modificações mediadas pela hipoxantina em parâmetros de estresse oxidativo em cérebro de ratos. Os autores verificaram aumento do valor de TBA e diminuição da atividade da SOD e CAT quando administrado somente a hipoxantina (agente causador do estresse), porém, nenhuma alteração nestes parâmetros foi verificada após a administração das

vitaminas C e E, indicando que a suplementação com estas vitaminas reduz a formação de radicais livres gerada pela hipoxantina.

Farooq *et al.* (2004) verificaram o efeito antioxidante da ficocianina em rim de ratos, frente a danos provocados pela administração de oxalato de sódio. Os autores confirmam o envolvimento de radicais livres formados pela administração de oxalato de sódio na mediação da peroxidação lipídica, resultando em deletérios danos renais, e demonstram a capacidade protetora da ficocianina frente a estas injúrias.

A ficocianina é considerada o principal componente antioxidante da *Spirulina*, sendo capaz de interagir com radicais livres e evitar os danos produzidos por eles (ROMAY *et al.*, 2001; HIRATA *et al.*, 2000; ROMAY, 1998; ESTRADA *et al.*, 1996).

CONCLUSÃO

A lipoperoxidação do córtex cerebral de ratos foi atenuada de forma significativa ($p=0,002$) pelo pigmento ficocianina, quando em presença do estressor glutamato monossódico.

A atividade da enzima superóxido dismutase foi aumentada significativamente ($p \leq 0,05$) pela adição de ficocianina ao tratamento com glutamato monossódico.

Os grupos tratados com o estressor (glutamato) e o antioxidante (ficocianina) não apresentaram diferença significativa do grupo controle quanto aos valores da enzima catalase.

Os resultados de atenuação da peroxidação lipídica e da ação das enzimas de defesa antioxidante SOD e CAT no córtex cerebral de ratos, quando em presença do estressor glutamato monossódico na concentração 4mg/g de peso corpóreo, mostram o efeito neuroprotetor da ficocianina e contribuem com a elucidação da ação antioxidante deste pigmento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** 105, 121-126. 1994.

AFANAS'VE, I.B. Free radical mechanisms of aging processes under physiological conditions. **Biogerontology.** 6, 283-290. 2005.

ANNIDA, B.; STANELY, P.M.P. Supplementation of Fenugreek Leaves Reduces Oxidative Stress in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **J. Med. Food** 8 (3), 382-385. 2005.

ANSARI, M.A; ROBERTS, K.N.; SCHEFF, S.W.; Oxidative stress and modifications of synaptic proteins in hippocampus after traumatic brain injury. **Free Radical Biol. Med.** 2008.

ASKOT, B.T.; ALI, R. The aging paradox: free radical theory of aging. **Experimental gerontology.** 34, 293-303. 1999.

BHAT, V.B.; MADYASTHA, K.M. Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against oxidative damage to DNA. **Biochem. Biophys. Res. Communications.** 285, 262–266. 2001.

BAVARESCO, C.S.; CHIARANI, F.; KOLLING, J.; NETTO, C.A.; WYSE, A.T.S Biochemical effects of pretreatment with vitamins E and C in rats submitted to intrastriatal hypoxanthine administration. **Neurochem. International.** 2008.

BONNEFOY, M.; DRAI, J.; KOSTKA, T. Antioxidants to slow aging, facts and perspectives. **Presse Medical.** 31, 1174-1184. 2002.

COHEN, Z. Products from microalgae. In: RICHMOND, A. **Handbook microalgal mass cult.** CRC Press Inc, Boca Raton, FL. 421-454. 1986.

COLLA, L.M.; COSTA, J. A. V., FURLONG, E.B., Antioxidant properties of *Spirulina platensis* cultivated under different temperature and nitrogen regimes. **Brazilian Arch. Biol.Technol.** 50, 161 – 167. 2007.

DINIZ, Y.S.et al. Toxicity of hypercaloric diet and monosodium glutamate: oxidative stress and metabolic shifting in hepatic tissue. **Food and Chem. Toxicol.** 42, 313-319. 2004.

ESTERBAUER, H. & CHEESEMAN, K., Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynoneal. **Method. Enzymol.**, 186, 407-408. 1990.

ESTRADA, J.E.P.; BESCÓS, P.; VILLAR, D.F. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco**. 56, 497-500. 1996.

FAROMBI E. O., ONYEMA O.O., Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. **Hum Exp Toxicol**. 25, 251-9. 2006.

FAROOQ, S.M.; ASOKAN, D.; KALAISELVI, P.; SAKTHIVEL, R.; VARALAKSHMI, P. Prophylactic role of phycocyanin: a study of oxalate mediated renal cell injury. **Chemico-Biological Interact**. 149, 1-7. 2004.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol**. 201: 1203-1209. 1998.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C. **Free Radicals in Biol. Med**. 3.ed.Oxford, New York, 2000.

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina – superalimento del futuro**. Barcelona: Urano, 1994.

HIRATA, T.; TANAKA, M.; OOIKE, M.; TSUNOMURA, T.; SAKAGUCHI. Antioxidant activities of phycocyanobilin prepared from *Spirulina platensis*. **J. Apl. Phycol**. 12, 435-439. 2000.

KALIL, S.J.; BURKET, C.A.V.; BURKET, J.F.M.; SILVEIRA, S.T.; MORAES, C.C.; COSTA, J.A.V. **Obtenção do extrato de ficocianina a partir de Spirulina sp.** Universidade Federal do Rio Grande, pedido de patente PI0801702-6. 2008.

KROON, P.A.; WILLIAMSON, G. Hydroxycinnamates in plant and food: current and future perspectives. **J. Sci. Food Agr**. 79, 355-361. 1999.

LEHNINGER, L.A.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Princípios de Bioquím**. 2. ed. São Paulo: Sarvier, 2000.

LOWRY, H.O.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J.Biol. Chem.** 193, 265-275, 1951.

MELLO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Bol. SBCTA.** 36, 1-11. 2002.

MICHIELS, C.; RAES, M.; TOUSSAINT, O.; REMACLE, J. Importance of Se-Glutathione Peroxidase, Catalase and Cu/Zn – SOD for cell survival against oxidative stress. **Free Radic.Biol. Med.**, 17, 235-248. 1994.

PARK, Y.K.; KOO, M.H.; CARVALHO, P.O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Bol. SBCTA.** 31, 200-206. 1997.

PÓVOA, H.; CALLEGARO, J.; AYER, L. **Nutrição cerebral.** Objetiva. Rio de Janeiro. 2005.

SOUZA, F.T.; MARGARITES, A.C.; COLLA, L.M.; COSTA, J.A.V., BERTOLIN, T.E. Avaliação do potencial antioxidante da ficocianina em sistema lipídico óleo de soja e azeite de oliva. **Alim. Nutr.**, Araraquara, 17, .275-279. 2006.

RICHMOND, A. Microalgae of economic potential. In: RICHMOND, A. **Handbook of microalgal mass culture.** CRC Press Inc, Boca Raton. 199-244. 1986.

RIMBAU, V.; CAMINIS, A.; ROMAY, C.; GONZALEZ, R.; PALLAS, M. Protective effects of C-phycoyanin against kainic acidinduced neuronal damage in rat hippocampus. **Neurosci. Lett.** 276, 75–78. 1999.

ROMAY, C. Antioxidants used in oils, fats and fatty foods. **Inflamm. Res.** 47, 36-41. 1998.

ROMAY, C.; REMÍREZ, D.; GONZÁLEZ, R. Actividad antioxidante de la ficocianina frente a radicales peroxílicos y la peroxidación lipídica microsomal. **Rev. Cubana Invest Biomed.** 20, 38-41. 2001.

TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. **Lipids.** 33, 583-588. 1998.

WILLIAMS, W.M.; CHUNG, Y.W. Evidences for an age-related attenuation of cerebral microvascular antioxidant response to oxidative stress. **Life Sci.** 79, 638-644. 2006.

YOSHIDA A.; TAKAGAKI Y.; NISHIMUNE T. Enzyme immunoassay for phycocyanin as the main component of *Spirulina* color in foods. **Biosci., Biotechnol., Biochem.** 60, 57-60. 1996.

CAPÍTULO V

CONCLUSÃO GERAL

5.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A ingestão de pequenas quantidades de biomassa microalgal (na maioria dos gêneros *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina*) pode afetar de forma positiva a fisiologia de animais, apresentando resposta imune não-específica e auxiliando o sistema imunológico (BELAY, 1993). Várias espécies de microalgas vêm sendo cultivadas visando à obtenção de compostos considerados nutracêuticos, como os ácidos graxos poliinsaturados eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) (TRIPATHI *et al.*, 1999; GILL e VALIVETY, 1997). A biomassa microalgal e os extratos de biomassa estão ganhando destaque no mercado mundial, devendo-se o aumento na demanda de produtos de origem algal, principalmente, ao fato de apresentarem substâncias com efeitos benéficos à saúde. O aumento na demanda de produtos de origem algal deve-se, principalmente, ao fato de apresentarem substâncias com efeitos antioxidantes, ácidos graxos polinsaturados (PUFA), proteínas imunologicamente efetivas e compostos virostáticos (COHEN, 1999). As microalgas são produzidas de forma contínua em curto período de cultivo e pequenas áreas, requerendo cuidados simples e dispensando a utilização de agrotóxicos (BERTOLDI *et al.*, 2008).

Nos últimos anos há um explosivo interesse no uso de substâncias nutricionais antioxidantes (GIGANTE *et al.*, 2007; SIMPORE *et al.*, 2006). Evidências epidemiológicas sugerem que a ingestão de algumas vitaminas, minerais e outros constituintes de alimentos pode ajudar na proteção do organismo de doenças do coração, câncer e processo de envelhecimento, e que antioxidantes podem ter um efeito protetor, na prevenção dessas doenças ou diminuindo sua severidade (HSIA *et al.*, 2007; LUCHSINGER *et al.*, 2007; MARCASON, 2007; WU *et al.*, 2005).

A *Spirulina* e os seus componentes possuem uma diversidade de propriedades nutricionais e terapêuticas que fazem dela, além de um excelente alimento, uma fonte potencial para emprego na prevenção e atenuação de várias enfermidades (AMBROSI *et al.*, 2008). Bermejo *et al.* (2008) concluíram em seus estudos que a *Spirulina* pode ser utilizada como suplemento antioxidante em uma dieta natural ou adicionada a produtos benéficos à saúde, tais como cereais ou bebidas, para prevenir algumas doenças crônicas onde radicais livres estejam envolvidos.

5.2 CONCLUSÃO GERAL

A microalga *Spirulina* apresentou atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* submetidas à geração de estresse oxidativo pela substância 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridílio (paraquat).

A *Spirulina* mostrou capacidade antioxidante, inibindo e/ou atenuando a ação lesiva que os radicais livres provocaram no córtex cerebral de ratos induzidos ao estresse oxidativo por glutamato monossódico ou por situação de pânico.

A ficocianina atenuou a peroxidação lipídica e manteve a atividade das enzimas SOD e CAT no córtex cerebral de ratos submetidos a administração de glutamato monossódico, demonstrando seu efeito antioxidante.

A microalga *Spirulina*, assim como a ficocianina, seus principais pigmentos, apresentaram capacidade antioxidante nos organismos vivos como levedura e ratos, visto que atenuaram os danos provocados pelos agentes estressores paraquat, glutamato monossódico e pânico, e mantiveram os parâmetros de sobrevivência celular, lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, estatisticamente iguais aos grupos controle.

A elucidação da ação antioxidante da microalga *Spirulina* contribui com a caracterização da mesma no âmbito dos alimentos funcionais antioxidantes.

CAPÍTULO VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARONSON, S.; BERNER, T.; DUBINSKY, Z. Microalgae as a source of chemicals and natural products. In: SHELEF, G.; SOEDER, C.J. **Algae biomass**. Amsterdam: Elsevier Biochemical Press. 576-601. 1980.

ABRAHAMSSON, T.; BRANDT, U.; MARKLUD, S.L.; SJOQVIST, P.O. Vascular bound recombinant extracellular superoxide dismutase type C protects against the detrimental effects of superoxide radicals on endothelium-dependent arterial relaxation. **Cir. Res.** 70, 264-271. 1992.

ADEGOKE, G.O., et al. Antioxidants and lipid oxidation in food – a critical appraisal. **J. of Food Sci. and Technol.** 35, 283-98. 1998.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** 105, 121-126. 1984.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Disponível em: **Erro! A referência de hyperlink não é válida.**

AKHGARI, M., ABDOLLAHI, M., KEBRYAEEZADEH, A., HOSSEINI, R., SABZEVARI, O. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. **Human & Experimental Toxicology.** 22, 205-211. 2003.

ALBERT, B.; BRAY, D.; LEXIS, J.; RASS, M.; ROBERT, K.; WATSON, J.D.. **Biol. Molec. da Cel.** 3ª ed., Porto Alegre: Artes médicas. ISBN 85-7307-191-5. 1997.

ALONSO, D.; MAROTO, F. Plants as 'chemical factories' for the production of polyunsaturated fatty acids. **Biotechnol. Adv.** 18, 481-497. 2000.

AMBROSI, M.A.; REINEHR, C.O.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V.; COLLA, L.M. Propriedades de saúde da microalga *Spirulina*. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** 29, 115-123, 2008.

ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Res. Inter.** 35,171-176. 2002.

ANDRADE, M.; MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Production of *Spirulina* biomass in south of Brazil. In: **6th Europea workshop Biotechnol. Microalgae.** 2005.

ANDREAZZA, A.C.; SOARES, D. G.; KEHL, L. F.; LIMA-BORELLA, M. L.; SALVADOR, M. Transtornos neuropsiquiátricos e estresse oxidativo. In: IZQUIERDO, I., QUEVEDO, J., KAPCZINSKI, F. **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos.** Porto Alegre: Artmed, 489-496.2004.

ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J. Vascular Brasileiro.** 3,145-154. 2004.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática.** Imprensa Universitária, Viçosa, 1995.

BAGCHI, D; PREUSS, H. G.; KEHRER, J. A. Nutraceutical and functional food industries: aspects on safety and regulatory requeriments. **Toxicol. Lett.**150, 1-2, 2004.

BANERJEE, B. D.; PASHA, S. T.; HUSSAIN, Q. Z.; KONER, B. C.; RAY, A. A comparative evaluation of immunotoxicity of malathion after subchronic exposure in experimental animals. **Indian J. of Experimental Biol.** 36:273-282. 1999.

BARNETT, Y.A., KING, C.M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of age in humans. **Mutation Res.** 338,115-128. 1995.

BELAY, A. Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina platensis*. **J. Appl. Phycol.** 5, 235-240. 1993.

BENZIE, I. F. F.; SZETO, Y. T. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. **J. Agric. Food Chem.** 47, 633-636. 1999.

BERMEJO, P.; PIÑERO, E.; VILLAR, A.M. Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. **Food Chem.** 110, 436–445. 2008.

BERTOLDI, F.C.; SANT'ANNA, E.; OLIVEIRA, J.L.B Revisão: Biotecnologia de microalgas. **B.CEPPA.** 26, 9-20. 2008.

BIANCHINI, A.; COSTA, J. A. V.; SILVA, D.C.M.; GONZALES, T.; CAVALETT, O. Desenvolvimento de produtos adicionado de *Spirulina platensis*. **IV Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos – SLACA.** 2001.

BIRCH, D. disponível em: <http://txt.estado.com.br/editorias/2006/03/26/ger73148.xml>, 2006.

BORUTAITE, V.; BROWN, G.C. Caspases are reversibly inactivated by hydrogen peroxide. **FEBS Lett.**, 500, 114-118. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **VII Lista dos novos ingredientes aprovados** – Comissões Tecnocientíficas de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Disponível em URL: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/novos_ingredientes.htm. 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução nº 16 de 30 de abril de 1999a. Diário Oficial da União de 03 de maio de 1999, Brasília, Seção 1-E, 11.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução nº 17 de 30 de abril de 1999b. Diário Oficial da União de 03 de maio de 1999, Brasília, Seção 1-E,11.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº 18 de 30 de abril de 1999c. Diário Oficial da União de 03 de maio de 1999, Brasília, Seção 1-E, 11.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº 19 de 30 de abril de 1999d. Diário Oficial da União de 03 de maio de 1999, Brasília, Seção 1-E, 11.

BUS, J. S.; AUST, S. D.; GIBSON, J. E. Lipid peroxidation: a possible mechanism for paraquat toxicity. **Res. Commun Chem. Pathol. Pharmacol.** 11, 31-38. 1975.

CADENAS, E.; DAVIES, K.J. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radic. Biol. Med.** 29, 222-230. 2000.

CALHEIROS, M. **Extração de lipídios a partir de microalgas**. Trabalho de Conclusão de Curso, Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, FURG. 2004.

CARACTERIZAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES DE ALIMENTOS VISANDO DETERMINAR O SEU POTENCIAL COMO ALIMENTO FUNCIONAL.

Disponível em : <http://bioinformatica.cenargen.embrapa.br/nutrigenomica/tikiindex.php?page=Antioxidantes>

CARR, N.G.; WITTON, B.A. **The Biol. of Cyanobacteria**. University of California Press. 1982.

CARVALHO, L. F. **Utilização de recursos hidrobiológicos de alta alcalinidade do sul do estado na aqüicultura de produção de microalgas**. Trabalho de Conclusão de Curso, Engenharia de Alimentos, Fundação Universidade Federal do Rio Grande - FURG. 2005.

CASTAGNE, V.; GAUTSCHI, M.; LEFEVRE, K.; POSADA, A.; CALRKE, P.G.H. Relationships between neuronal death and the cellular redox status focus on the developing nervous system. **Prog. In Neurobiol.** 59, 397-423. 1999.

CAVALETT, O.; BIANCHINI, A.; SILVA, D.C.M.; GONZALES, T.; COSTA, J. A. V. Formulação de um pó para pudim de chocolate enriquecido com *Spirulina platensis*. **XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS**. Porto Alegre. 2002.

CAVALETT, O.; BIANCHINI, A.; SILVA, D.C.M.; GONZALES, T.; COSTA, J. A. V. Elaboração de uma bebida isotônica com *Spirulina platensis*. **XIII Salão de Iniciação Científica da UFRGS**. Porto Alegre. 2002.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiol. Rev.** 59, 527-605. 1979.

CIFERRI, O.; TIBONI, O. The biochemistry and industrial potencial of *Spirulina*. **Annals Rev. Microbiol.** 39, 503-526. 1985.

COBAIAS DE LABORATÓRIO, disponível em: <http://www.brasilecola.com/curiosidades/cobaias-de-laboratorio.htm>. 2007.

COHEN, Z. **Chemicals from microalgae**. London: Taylor e Francis, 1999.

COLLA, L.M.; MUCCILLO-BAISCH, A.L.; COSTA, J.V. *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits fed with a hypercholesterolemic diet. **Braz. Arch. Biol. Technol.** 51:405-11. 2008.

COLLA, L.M.; COSTA, J. A. V.; REICHERT, C. Avaliação de metodologia para determinação de compostos fenólicos na microalga *Spirulina platensis*. **X Congresso de Iniciação Científica**. 2002.

DAL-PIZZOL, F.; KLAMT, F.; VIANNA, M.; SCHRODER, N.; QUEVEDO, J.; BENFATO, M. S.; MOREIRA, J. C. F.; WALZ, R. Lipid peroxidation in hippocampus early and late after status epilepticus induced by pilocarpine or kainic acid in Wistar rats. **Neuros. Letters.** 291:179-182. 2000.

DEAN, R.T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M.J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem. J.** 324, 1-18. 1997.

DEVI, M.A.; VENKATARAMAN, L.V. Hypocholesteremic effect of blue-green algae *Spirulina platensis* in albino rats. **Nutr. Rep. Int.** 28:519-30. 1983.

DILLON, J.; PHUC, A. P.; DUBACQ, J. P. Nutritional value of the alga *Spirulina*. **Plants in Human Nutrit.** 77, 32-46. 1995.

DRI. Dietary Reference Intake. **Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids.** Institute of Medicine (IOM), 2000. Disponível em: http://books.nap.edu/openbook.php?record_id=9810&page=509

DUARTE FILHO, P.; COLLA, L. M; COSTA, J. A. V., *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. **A Journal of Biosciences.** 2003.

DURAND-CHASTEL, H. Production and use of *Spirulina* in México. In: SHELEF, G.; SOEDER, C.J. **Algae biomass.** 51-64. 1980.

ESPÍN, J.C.; SOLER-RIVAS, C.; WICHERS, H.J. Characterization of the total free scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2 diphenyl- 1-picrylhydrazyl radical. **J. Agric. Food Chem.** 48, 648-656. 2000.

ESTERBAUER, H. & CHEESEMAN, K., Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynoneal. **Method. Enzymol.**, 186, 407-408. 1990.

ESTRADA, J.E.P.; BESCÓS, P.; VILLAR, D.F. Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Farmaco.**56, 497-500. 2001.

EVANS, W.J. Vitamin E, vitamin C, and exercise. **American J. of Clin. Nutrit.** 72, 647-652. 2000.

FANG, Y.Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants and nutrition. **Nutrition J.** 18, 872-879. 2000.

FAROMBI, E.O; ONYEMA, O.O. Monosodium glutamate-induced oxidative damage and genotoxicity in the rat: modulatory role of vitamin C, vitamin E and quercetin. **Hum Exp Toxicol.** 25, 251-259. 2006

FARRINGTON, J. A. *et al.* Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. **Biochem. Biophys. Acta**, 314, 372-81. 1973.

FLOYD, R. A.; HENSLEY, K. Oxidative stress in brain aging implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. **Neurobiology of Aging.** 23, 795-807. 2002.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201: 1203-1209. 1998.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Ann. Rev. Biochem.** 64, 97-112. 1995.

GALLOWAY, T.; HANDY, R. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. **Ecotoxicol.** 12, 345-363. 2003.

GIGANTE, D. P.; BUCHWEITZ, M.; HELBIG, E.; ALMEIDA, A. S.; ARAUJO, C. L.; NEUMANN, N. A. Randomized clinical trial of the impact of a nutritional supplement "multimixture" on the nutritional status of children enrolled at preschools. **J. Pediatrics.** 83, 363-369. 2007.

GILGUN-SHERKI, Y.; ROSENBAUM, Z.; MELAMED, E.; OFFEN, D. Antioxidant therapy in acute central nervous system injury: current state. **Pharmacol. Rev.** 54 (2), 271-284. 2002.

GILL, I.; VALIVETY, R. Polyunsaturated fatty acids, part 1: occurrence, biological activities and applications. **Trends in Biotechnol.** 15, 401-409. 1997.

GIRI, S. N. *et al.* Effect of paraquat on plasma enzymes, insulin, glucose, and liver glycogen in the rat. **Environ Res.**, 20, 300-308. 1979.

GLUTAMATO E SABOR, disponível em: **Erro! A referência de hyperlink não é válida.**Glutamato e_sabor.asp

GUPTA, R. C.; MILATOVIC, D.; DETTBARN, W. D. Depletion of energy metabolites following acetylcholinesterase inhibitor-induced status epilepticus: protection by antioxidants. **NeuroToxicology**. 22, 271-282. 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. **Free Radicals Biol. Med.**. Nova York: Oxford University Press, 1, 2007.

HALLIWELL, B.; Oxidative stresse and neurodegenerative: where are we now. **J. Neurochem**. 97, 1634-1658. 2006.

HALLIWELL, B. Micronutrients: oxidant/antioxidant status. **Brit J Nutr**. 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.C. **Free Radicals Biol. Med.** 3.ed. Oxford, New York, 2000.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radicals Biol. Med.** 3rd ed. New York: Oxford, 1999.

HALLIWELL, B.; Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. **Biochem. Soc. Transactions**. 24, 1023-1027. 1996.

HASLER, C. M. Functional foods: their role in disease in: developing new food products for a changing prevention and health promotion. **Food Technol**. 52, 57-62. 1998.

HENRIKSON, R. **Microalga Spirulina – Superalimento del futuro**. Barcelona: Ediciones S.A. Urano, ISBN 84-7953-047-2. 1994.

HENRIQUES, J.A.P.; DAFRÉ, A.L.; PICADA, J.N.; MARIS, A.F.; SALVADOR, M. Espécies reativas de oxigênio e avaliação de antioxidantes em sistemas biológicos. In: NATALI, M. R. M.; SOARES, ^a; SCHOFFEN, J. P. F. E GOUVEIA, E. M. D. **Efeitos do tratamento com glutamato monossódico nos neurônios do plexo mioentérico do**

íleo de ratos (*Rattus norvegicus*). Universidade Estadual de Maringá, Maringá – PR – Brasil, 2001.

HERCBERG, S.; GALAN, P.; PREZIOSI, P.; ROUSSEL, A.M.; ARNAUD, J.; RICHARD, M.J.; MALVY, D.; PAULDAUPHIN, A.; BRIANCON, S.; FAVIER, A. Background and rationale behind the SU.VI. MAX study, a prevention trial using nutritional doses of a combination of antioxidant vitamins and minerals to reduce cardiovascular diseases and cancers. **Intern. J. Vitamins and Nutrit. Res.** 68, 3- 20. 1998.

HSIA, J., HEISS, G., REN, H., ALLISON, M., DOLAN, N. C., GREENLAND, P. Calcium/vitamin D supplementation and cardiovascular events. **Circulation.** 115, 846–854. 2007.

HUNGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opin. in Biotechnol.** 13, 497-507. 2002.

JACOB, R.A. The integrated antioxidant system. **Nutrit. Res.** New York, 15, 755-766. 1995.

JOURDAN, J.P. **Cultivez votre spiruline – manuel de culture artisanale.** Disponível em: <http://www.spirulinasource.com/cultivez>. 1996.

KALIL, S.J.; BURKET, C.A.V.; BURKET, J.F.M.; SILVEIRA, S.T.; MORAES, C.C.; COSTA, J.A.V. **Obtenção do extrato de ficocianina a partir de Spirulina sp.** Universidade Federal do Rio Grande, pedido de patente PI0801702-6. 2008.

KITTS, D.D. Bioactive substance in food: identification and potential use. **Canada J. Physiol. Pharmacol.** 72, 423-434. 1994.

KOUTSILIERI, E., SCHELLER, C., TRIBL, F., RIEDERER, P. Degeneration of neuronal cells due to oxidative stress – microglial contribution. **Parkinsonism and Related Disorders.** 8:401-406. 2002.

KRUGER, C. L.; MANN, S. W. Safety evaluation of functional ingredients. **Food and Chemical Toxicology**. 41, 793-805. 2003.

LEBOVITZ, R.M.; ZHANG, H.; VOGEL, H.; CARTWRIGHT, J. Jr.; DIONNE, L.; LU, L.; HUANG, S.; MATZUK, M.M. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 93, 9782-9787. 1996.

LEVINE, R. L.; BERLLET, B. S.; MOSKOSVITZ, J.; MOSONI, L.; STADTMAN, E.R. Methionine residues may protect protein from critical oxidative damage. **Mech. Ageing Dev.**, 107, 323-332. 1999.

LI, Y.; HUANG, T.T.; CARLSON, E.J.; MELOV, S.; URSELL, P.C.; OLSON, J.L.; NOBLE, L.J.; YOSHIMURA, M.P.; BERGER, C.; CHAN, P.H; WALLACE, D.C.; EPSTEIN, C.J. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. **Nat. Genet.** 11, 376-381. 1995.

LOWRY, H.O.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265-275, 1951.

LUCHSINGER, J. A.; TANG, M. X.; MILLER, J.; GREEN, R.; MAYEUX, R. Relation of higher folate intake to lower risk of Alzheimer disease in the elderly. **Arch. Neurol.** 64, 86–92. 2007.

MARCASON, W. Is supplementation of B vitamins still recommended to reduce the risk of heart disease? **J. American Dietetic Assoc.** 107, 525. 2007.

MEERSON, F.Z.; KAGAN, V.E.; KOSLOV, Y.P.; BELKINA, L.M.; ARKIPENKO, Y.V. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of damage and antioxidant protection of the heart. **Basic. Res. Cardiol.** 77, 465-485. 1982.

MORAIS, M. G.; COSTA, J. A. V. Isolation and Selection Microalgae for the Biofixation of Carbon Dioxide. **Biotechnol. Lett.**, 2006.

MOREIRA, A.V.; et al. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Rev. Nutrition**. 17, 411-424. 2004.

NEUMANN, P., et al. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimentos, nutracêuticos....você já ouviu falar? **Higiene Alimentar**. 14, 19-23. 2000.

NIKI, E.; NOGUSHI, N.; TSUCHIHASHI, H.; GOTOH, N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and b--carotene. **American J. Clin. Nutrit**. 62, 1322-1326. 1995.

NOONAN, W. P.; NOONAN, C. Legal requirements for "functional foods" claims. **Toxicology Letters**. 150, 19-24. 2004.

PETER, B. *et al.* Role of lipid peroxidation and DNA damage in paraquat toxicity and the interaction of paraquat with ionizing radiation. **Biochem. Pharmacol.**, 43, 705-715. 1992.

PIMENTEL, B. M. V.; FRANCKI, M.; GOLLÜCKE, B. P. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 2005.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **Intern. J. Vitamin Nutrit. Res**. 67, 289-297. 1997.

RADMANN, E.; CALHEIROS, M. N.; SANTOS, G.C.; CERQUEIRA, V.S.; KALIL, S.J.; COSTA, J.A.V. Cultivo de Microalgas para Produção de Ácidos Graxos. **XV SINAIFERM (Simpósio Nac. Bioproc.)**. 2005.

REINEHR, C. O. **Cultivo da Cianobactéria *Spirulina platensis* em Modo Semicontínuo**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande – FURG. 2003.

RICHMOND, A. *Spirulina*. In: BOROWITZKA, M.A.;BOROWITZKA, L.J. (Eds). **Micro-algal biotecnol.** Cambridge: Cambridge University, 85-121.1988.

RICHMOND A. **Handbook of microalgal mass culture**. Boston: CRC Press; 1990.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. 34,105-10. 2002.

SAGARA, Y., DARGUSCH, R., CHAMBERS, D., DAVIS, J., SCHUBERT, D., MAHER, P. Cellular mechanisms of resistance to chronic oxidative stress. **Free Radical Biol. Med.** 24, 1375-1389. 1998.

SALGADO, J. **Antioxidantes X Radicais Livres**. Disponível em: **Erro! A referência de hyperlink não é válida.**..aspx?texto.aspx?idContent=529&idContentSection=290. 2007.

SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M.; AZEVEDO, J.L. (Eds.) Biotecnologia na Agricultura e na Agroindústria. **Guaíba: Agrop.** 1, 227-252. 2001.

SGARBI, L. Disponível em: <http://www.terra.com.br/istoe/>, 2007.

SIMPORE, J.; KABORE, F.; ZONGO, F.; DANSOU, D.; BERE, A.; PIGNATELLI, S. Nutrition rehabilitation of undernourished children utilizing Spiruline and Misola. **Nutrit. J.** 2006.

SMITH, P.; HEATH, D. Paraquat. **CRC Crit. Rev. Toxicol.** 4, 411-45. 1976.

SOARES, D. G. Avaliação da Capacidade Antioxidante do Butil hidroxitolueno, Propil galato, Resveratrol, Vitamina C e Vitamina E em Sistemas Biológicos e Químicos. **Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) Univ. Caxias do Sul – Inst. de Biotecnologia**. 2001.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos antioxidantes em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* . **Brazilian J. of Pharm. Sci.** 41. 2005.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A.C.; SALVADOR, M. Sequestering ability of butylated hydroxytoluene, propyl gallate, resveratrol, and vitamins C and E against ABTS, DPPH,

and hydroxyl free radicals in chemical and biological systems. **J. Agric. Food Chem.** 51, 1077-1080. 2003.

SOUTHORN, P. A.; POWIS, G. Free radicals in medicine. Nature and biologic reactions. **Mayo Clennic Proceeding.** 63, 381-389. 1998.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA.** 37, 127-135. 2003.

TAIPINA, M. S.; FONTS, M. A. S.; COHEN, V. H. Alimentos funcionais – nutracêuticos. **Hig. Alimentar.** 16, 28-29. 2002.

TRABER, M.G. Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. **Mineral and Electrolyte Metabol.** 23, 135-139. 1997.

TRIPATHI, U.; SARADA, R.; RAO, S. R.; RAVISHANKAR, G. A. Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. **Bioresource Technol.** 68, 197-199. 1999.

URSO, M. L., CLARKSON, P. M. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. **Toxicology.** 189, 41-54. 2003.

VON DER WEID D, DILLON JC, FALQUET J. **Malnutrition: a silent massacre.** Geneve: Antenna Technology; 2000.

VONSHAK, A. **Spirulina platensis (Arthospira): Physiology, cell biology and biotechnology.** Taylor e Francis, London.1997.

ZWART, L. L.; MEERMAN, J. H. N.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. **Free Radical Biol. Med.** 26, 202-226. 1999.

WALZEM, R. L. Functional Foods. **Trends in Food Sci. and Technol.** 15, p. 518, 2004.

WANG, M.; JIN, Y.; HO, C.T. Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2,2 diphenyl 1- picrylhydrazyl radical. **J. Agric. Food Chem.** 47, 3947-3977. 1999.

WARD, R.J.; PETRES, T.J. Free radicals. In: MARSHALL, W.J.; BANGERT, S.K. **Clinical Biochemistry: Metabolic and Clinical Aspects.** New York: Churchill Livingstone. 765-777. 1995.

WU, L. C.; HO, J. A.; SHIEH, M. C.; LU, I. W. Antioxidant and antiproliferative activities of Spirulina and Chlorella water extracts. **J. Agricul. Food Chem.** 53, 4207–4212. 2005.