

Uma abordagem sobre caracterização e avaliação do potencial antioxidante de extratos fenólicos de microalgas *Spirulina* sp. LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*

An approach on characteristics and potential assessment of antioxidant extracts from phenolic microalgae Spirulina sp. LEB-18 and Chlorella pyrenoidosa

Adriana R. Machado*, Carolina S. Graça, Leticia M. de Assis e Leonor A. de Souza-Soares

Laboratório de Ciência de Alimentos, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG. Avenida Itália KM.8 – Cep: 96203-900 – Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil.

(*E-mail: adriana.rodriguesmachado@yahoo.com.br)

<http://dx.doi.org/10.19084/RCA16011>

Recebido/received: 2016.01.25

Recebido em versão revista/received in revised form: 2016.04.09

Aceite/accepted: 2016.04.09

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar a composição proximal, perfil de aminoácidos, digestibilidade proteica, quantificação dos fenóis individuais e totais e o efeito antioxidante dos extratos fenólicos da *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa* frente a varios metodos. As microalgas *Spirulina* e *Chlorella* destacam-se quanto ao seu perfil nutricional e atividade antioxidante, através de diferentes mecanismos, sendo o mais importante o sequestro de radicais livres, que depende da estrutura do composto envolvido. As microalgas foram avaliadas quanto a composição proximal, aminograma, digestibilidade proteica *in vitro*, extração e quantificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência, como também, determinação da atividade antioxidante através do sequestro dos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e ABTS+ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)), e do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Conclui-se que ambas as microalgas possuem perfil completo de aminoácidos, uma boa atividade antioxidante frente aos métodos utilizados, com destaque para a *Spirulina*, que apresentou valores superiores comparado a *Chlorella*.

Palavras-chave: aminoácidos, extratos, perfil, radicais.

ABSTRACT

The object of the study was to evaluate the proximate composition, amino acid profile, protein digestibility, quantification of individual and total phenols and antioxidant effect of phenolic extracts of *Spirulina* LEB-18 and *Chlorella pyrenoidosa* front of various methods. The *Spirulina* and *Chlorella* microalgae stand out on the nutrient profile and antioxidant activity through different mechanisms, the most important being the scavenging free radicals, which depends on the structure of the compound involved. Microalgae were evaluated for proximate composition, aminogram, protein digestibility *in vitro*, extraction and quantification of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography, as well as, the antioxidant activity through the kidnapping of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrilhidrazil) and ABTS+ (2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid-6)), and β -carotene / linoleic acid system. It is concluded that both microalgae have complete amino acid profile, a good antioxidant activity against the methods used, especially spirulina, which showed higher values compared to *Chlorella*.

Keywords: amino acid, extracts, profile, radicals.

INTRODUÇÃO

A procura de novas substâncias antioxidantes, especialmente de origem natural, tem sido objeto

de vários estudos (Oliveira *et al.*, 2009; Pessuto *et al.*, 2009), como as microalgas. As microalgas representam os microrganismos fotossintéticos

procarióticos (cianobactérias) denominadas algas azul-esverdeadas, e eucarióticos (algas verdadeiras), (Olaizola, 2003), e vivem, em sua maioria, em ambientes aquáticos a partir de sistemas de água doce e marinhos (Tomaselli, 1997; Pignolet *et al.*, 2013). Sua importância na natureza deve-se principalmente à elevada participação no balanço global da fotossíntese, contribuindo com grande parcela da produção primária do planeta. No mar, cerca de 90% da fotossíntese é realizada pelas diversas microalgas que constituem o fito plâncton (Lourenço, 2006). Dentre elas destacam-se a *Spirulina platensis* e a *Chlorella pyrenoidosa*.

As microalgas dos gêneros *Spirulina* e *Chlorella* têm sido estudadas pelo seu potencial nutricional, por apresentarem principalmente elevada qualidade e quantidade de proteínas, contendo aminoácidos essenciais, vitaminas, minerais e ácidos gordos polinsaturados. Além destes compostos, suas células apresentam produtos do metabolismo secundário, que induzem efeitos fisiológicos, como, por exemplo, os compostos fenólicos (ácido cafeico, clorogênico, salicílico, trans-cinâmico), tocoferol e pigmentos (carotenoides, ficocianina e clorofila), aos quais são atribuídas suas propriedades potencialmente funcionais (Parisi *et al.*, 2009; Assis, 2012; Machado *et al.*, 2014).

A *Spirulina platensis* apresenta propriedades antioxidantes, devido a presença de compostos fenólicos, favorecendo o seu uso como alimento funcional (Abedin & Taha, 2008; Souza *et al.*, 2011; Tantawy, 2011). A microalga *Chlorella* é uma alga verde unicelular do grupo das clorofíceas, eucariótica, encontrada, tanto em água doce como em ambiente marinho, sendo amplamente utilizada como suplemento alimentar (Kralovec *et al.*, 2005). Esta microalga tem demonstrado excelentes resultados no combate à hipertensão, na redução dos níveis de colesterol e pelo bom funcionamento do organismo (Souza, 2012).

Os compostos fenólicos podem ser uma alternativa promissora, e o seu perfil e mecanismos de ação é fundamental para recomendar a utilização destes compostos (Souza *et al.*, 2015). Para a extração dos compostos fenólicos vêm sendo usadas soluções aquosas, alcoólicas, aceto-etílicas e hexânicas sob diferentes condições de interação entre solventes extratores e matriz. O conhecimento da presença

destes compostos em um determinado tipo de tecido, e de seu mecanismo de atuação, além da contribuição científica pode ser subsídio para desenvolvimento de tecnologias que permitam o emprego destas substâncias para fins de produção de insumos alimentícios e medicamentos (Souza, 2012). Com isso, diversos estudos surgem sobre compostos bioativos extraídos de microalgas que têm enfatizado e demonstrado as suas atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antifúngica, citotóxica e propriedades de inibição enzimática, entre outras (Colla *et al.*, 2007; Hajimahmoodi *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2011). Estas propriedades tornaram as microalgas alvo de usos terapêuticos para cura ou prevenção de doenças crônicas tais como diabetes, hipertensão, hipercolesterolemia e outras (Belay, 2002).

O objetivo do estudo foi avaliar a composição proximal, digestibilidade proteica, perfil de aminoácidos, quantificação dos fenóis individuais e totais e o efeito antioxidantes dos extratos fenólicos da *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa* frente a varios metodos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e cultivo das microalgas

A microalga *Spirulina* LEB-18, lote 2013, foi fornecida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande, (FURG), Brasil, e armazenada em recipientes plásticos sob refrigeração, até o momento da extração dos compostos fenólicos. A *Spirulina* LEB-18 foi isolada da Lagoa Mangueira e cultivada em uma planta piloto localizada próximo da costa dessa lagoa, constituída por três tanques revestidos com fibras, agitados por pás, localizados no interior de uma estufa de filme de polietileno transparente. A cultura foi adicionada aos tanques de produção, em quantidade suficiente para uma produção inicial de 10.000 L em cada tanque. As culturas foram mantidas sob luz natural no tanque por 387 dias. A biomassa de *Spirulina* LEB-18 foi retirada dos tanques, seca em estufa e triturada em moinho de facas (Costa *et al.*, 2002; 2004; Morais *et al.*, 2009). Foi utilizada a biomassa seca da microalga *Chlorella pyrenoidosa*, adquirida no comércio da cidade de Pelotas-RS, com granulometria das partículas de 125 µm.

Composição proximal

A amostra de *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa* foram analisadas quanto à humidade conforme a metodologia descrita por AOAC (2000), que consiste na secagem direta em estufa com circulação de ar a 105 °C. O teor de cinzas foi determinado por método gravimétrico em mufla à temperatura de 550 °C. O teor de proteína bruta foi determinado pelo método micro-Kjeldahl, utilizando-se como fator de conversão 4,92 para todas as amostras. O teor lipídico foi determinado utilizando o extrator de Soxhlet e éter de petróleo como solvente.

Digestibilidade proteica *in vitro*

A determinação da digestibilidade proteica *in vitro* das microalgas foi realizada de acordo com Sgarbieri (1987, 1996) e Cintra *et al.* (2007). Primeiramente foram pesados 1 grama de microalga seca, adicionados 10 mL de solução de pepsina 1.5 mg/mL para cada amostra, seguido de agitação em mesa agitadora orbital, TE – 141 (TECNAL), sob temperatura de 37 °C, durante 150 min. ininterruptos a 150 rpm. Adicionou-se 10 mL de solução de NaOH 0.3 N, para neutralizar o pH (Feddern *et al.*, 2007). Posteriormente, foi realizada a centrifugação a 3220 x g por 15 min., logo se guardou o sobrenadante a 4 °C. Em seguida adicionou-se aos precipitados 10 mL de solução de pancreatina 1.5 mg/mL em tampão fosfato pH 8.0, agitou-se em mesa agitadora, sob temperatura de 37 °C, durante 24 horas a 150 rpm. Interrompeu-se a reação em banho-maria a 100°C/20min., centrifugou-se a 5000 rpm por 15min., a seguir foi realizada a filtração e quantificação da proteína por Folin-Ciocalteu (1:2) a 660 nm, conforme Lowry *et al.* (1951).

Perfil de aminoácidos

A determinação dos aminoácidos essenciais nas amostras foi realizada pela empresa CBO – Análises Laboratoriais (Campinas/SP), utilizando um analisador de aminoácidos SPC1000 adaptado para o método de derivatização pré-coluna com fenilisotiocianato PITC e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, utilizando detecção em UV a 254 nm. O conjunto é constituído de desgaseificador, módulo de bomba quaternária, válvula de injeção Rheodyne, módulo de forno e módulo de detecção UV, equipado com coluna LUNA C18 100 Å 5u, 250 x 4.6 mm 00G-4252-EQ. O escore de aminoácidos foi calculado através da razão entre os valores

de aminoácidos essenciais das amostras (mg/g) e valores padrão FAO/WHO (1991).

Extração dos compostos fenólicos totais

A extração dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com Souza (2012), com adaptações, onde foram pesados 3 gramas de microalga seca, adicionados 35 mL de metanol para cada amostra, seguido de agitação em mesa agitadora orbital, TE – 141 (TECNAL), sob temperatura de 45 °C, durante 120 min ininterruptos a 230 rpm. Posteriormente, foi realizada a centrifugação a 3220 x g por 15 min, e os solventes foram evaporados em evaporador rotatório a 50 °C. Os extratos foram filtrados e clarificados com 10 mL de hidróxido de bário 0.1M e 10 mL de sulfato de zinco 5%. As soluções foram filtradas e transferidas quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL, sendo o volume final completado com água.

A determinação quantitativa dos compostos fenólicos nos extratos foi realizada por espectrofotometria de UV/VIS utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. O procedimento consistiu em tomar alíquota de 500 µL do extrato, agitar com 500 µL de água destilada e 4.5 mL de Na₂CO₃ 4% por 1 min, colocando em banho-maria a 40 °C por 15 min. As misturas foram agitadas por 30 segundos, em banho ultra-som, com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu diluído 1:2 com água destilada. Após 10 min, foi medida a absorvância das soluções em comprimento de onda de 750 nm. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras, a partir de uma curva analítica construída ($y=0.034x$) com uma solução padrão de ácido gálico contendo 100 µg/mL, da qual foram preparadas diluições variando entre 20 e 80 µg/mL. Os resultados foram expressos como µg de equivalente de ácido gálico (AGE) / g de *Spirulina platensis*.

Perfil dos ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos das microalgas foram identificados e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência. Uma alíquota de 20 µL de amostra dos extratos de fenólico de *Spirulina* e *Chlorella* (diluídos em água:metanol, 1:1) foram injetadas em um cromatógrafo (Shimadzu, Tokyo, Japan, CLASS-M10A), em fluxo de 0,9 mL/minutos, 103Kgf, a temperatura de 35 °C. A separação dos ácidos fenólicos foi realizada utilizando uma coluna de

fase reversa C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) e um gradiente isocrático de solventes constituído por metanol e água acidificada (ácido acético 1%) na relação 20:80 v/v, durante 25 min, usando detecção a 280 nm até 15 min e 320 nm até 25 min. Os ácidos fenólicos foram identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção com diversos padrões de ácidos fenólicos presentes em farelo de arroz (caféico, clorogênico, felúrico, gálico, hidroxibenzóico, protocatecóico e vanilina, obtidos da Sigma- Aldrich USA), conforme descrito na literatura (Zhou *et al.*, 2004; Mira *et al.*, 2008; Poulari *et al.*, 2010). O limite de detecção (LOD) foi calculado pela relação sinal ruído do branco (solução contendo os solventes utilizados na extração dos compostos fenólicos) de 3:1. O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido como sendo três vezes o valor do LOD (Ribani *et al.*, 2004). O método utilizado foi de acordo com Schmidt (2014), com modificações.

Determinação da atividade antioxidante (in vitro)

Sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

A atividade antioxidante dos extratos fenólicos das microalgas foi medida utilizando procedimento descrito por Herrero *et al.* (2005) com modificações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pela amostra, através da determinação do decréscimo da unidade de absorvância (uA) nas soluções contendo os extratos fenólicos. As medidas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (VARIAN/CARY-100) em comprimento de onda 515 nm. Aos tubos contendo 3.0 mL da solução metanólica de DPPH ($5,2 \times 10^{-5}$ mol/L) foram adicionados 0.5 mL de metanol e 0.5 mL dos extratos fenólicos na concentração de 80 mg/mL. A mistura reativa permaneceu a temperatura ambiente, sem a incidência de luz e a mudança de cor violeta para amarela foi medida após 30. min. de reação. A solução de DPPH foi preparada diariamente e estocada em frascos âmbar cobertos com folhas de alumínio, mantidas no escuro a 4 °C até o momento das determinações. A capacidade de sequestrar radical livre foi expressa como percentual de inibição de oxidação do radical e calculado conforme equação a seguir:

$$\% \text{ Inibição} = ((A_{\text{Extr}} - A_{\text{DPPH}}) / A_{\text{DPPH}}) * 100 \quad (1)$$

Onde A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH e A_{Extr} é a absorvância da amostra em solução. A_{Extr} foi

calculada com base na diferença entre a absorvância da solução de amostra em teste com o seu branco.

Captura do radical ABTS⁺ (2,2'-azinobis (3-etil-benzotiazolina-6-ácido sulfônico))

A capacidade de captura do radical catiônico ABTS⁺ pelas amostras foi realizada de acordo com Re *et al.* (1999). Primeiramente, o ABTS foi dissolvido em água deionizada na concentração de 7mM (p/v), e persulfato de potássio foi adicionado na concentração de 2.45mM (p/v). O radical ABTS⁺ foi gerado pela oxidação do ABTS com o persulfato de potássio. A solução foi deixada por 16h no escuro à temperatura ambiente. Após, a solução foi diluída com etanol, até alcançar uma absorvância de 0.700 ± 0.020 a 734 nm. Foram colocadas 3.0 mL de solução diluída de ABTS⁺ e 30 µL dos extratos de *Spirulina* e *Chlorella* na concentração de 80 mg/mL. As medidas de absorvância foram realizadas a 734nm após 6 min de reação. Os valores foram expressos em atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) como µM Trolox.g⁻¹ de microalga, usando uma curva de calibração de Trolox (de 100 a 2000 µM/ml, $y = -0.118x + 0.818$, $R^2 = 0.9599$).

Sistema β-caroteno/ácido linoleico

Este método foi originalmente descrito por Marco (1968) e posteriormente modificado por Miller (1971). Para o preparo da mistura reativa, adicionou-se 27µL de ácido linoleico, 0.1 mL de Tween 80 e 1 mL da solução de β-caroteno a 0.1 mg/mL em clorofórmio. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio. A esta mistura isenta de clorofórmio, adicionou-se 50 mL de água deionizada sob vigorosa agitação. A mistura reativa apresentou-se límpida e com absorvância entre 0.6 e 0.7nm, a 470nm. O procedimento consistiu em adicionar uma alíquota de 5 mL da mistura reativa em tubos de ensaio contendo 0.5 mL dos extratos na concentração de 80 mg/mL, e a absorvância foi medida imediatamente a 470nm. Após a primeira leitura os tubos foram incubados em banho-maria a 50°C e medido a absorvância de 15 em 15 min. até completar 120 min. Juntamente com os extratos foi realizada a leitura do branco, sendo que para o preparo da mistura reativa do branco foi adicionado somente o ácido linoleico e Tween 80. O percentual de atividade antioxidante foi determinado pela equação 2:

$$\% \text{ AA} = (\text{Abs branco } 0' - \text{Abs branco } 120') / \text{Abs amostra } 0' - \text{Abs amostra } 120' \times 100 \quad (\text{Eq. } 2)$$

Análise estatística

Para as análises estatísticas foi utilizada a análise de variância (ANOVA), seguida do teste de Tukey com nível de significância $p < 0,05$ (Statistica, ver. 7).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Composição proximal e digestibilidade *in vitro*

O Quadro 1 apresenta a composição proximal e a digestibilidade proteica das microalgas *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*.

A composição proximal determinada para as microalgas foi semelhante à encontrada por outros autores, levando-se em conta as diferenças decorrentes do tipo de cultivo e de outras variáveis abióticas (Henrikson, 1994; Colla *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2010; Souza, 2012). De acordo com Souza (2012), os dados obtidos permitem afirmar que as microalgas estudadas são basicamente constituídas por proteínas e hidratos de carbono.

Lisboa *et al.* (2016), confirmam, em seu trabalho com hidrolisados proteico, que a biomassa de *Spirulina* sp. LEB 18 tem uma alta concentração de proteína e as condições requeridas para crescimento podem ser alteradas para estimular uma concentração mais elevada deste bioproduto, a concentração obtida por estes autores foi 51.66%, semelhante a este estudo (Quadro 1). Os valores de humidade, cinzas e lipídios encontrados neste trabalho para a *Spirulina* LEB-18 foram superiores aos obtidos por

Assis (2012) para a mesma microalga, que foram de 5.3%, 6.7% e 3.3%, para estes teores, respectivamente. Para *Chlorella pyrenoidosa* os teores encontrados de proteína, e lipídios, conforme o Quadro 1, foram inferiores aos encontrados por Varandas *et al.* (2015) que obtiveram teor de lipídios de 8% e de proteína de 68.2%. Essas diferenças encontradas nos resultados desta pesquisa comparados com outros estudos se devem as alterações atribuídas às condições do cultivo e/ou às características genéticas da linhagem de *Chlorella* estudada.

A digestibilidade proteica é medida pela quantidade de proteína hidrolisada pelas enzimas digestivas até aminoácidos, portanto, disponível para a absorção como aminoácidos pelo organismo animal ou humano (Sgarbieri, 1987). As paredes celulares da *Spirulina*, assim como da *Chlorella*, são similares às das bactérias gram-positivas, consistindo no polissacarídeo glicosamina e em ácido murâmico, associados a peptídeos, não contendo celulose como as macroalgas. Os polissacarídeos extracelulares ou exopolissacarídeos (EPS), sintetizados por cianobactérias, podem ser facilmente recuperados e possuem alto potencial de utilização pela indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia como estabilizantes, emulsificantes e espessantes (De Philippis & Vincenzini, 1998).

Perfil de aminoácidos das microalgas

No Quadro 2 encontram-se os perfis de aminoácidos e o teor de proteína total realizado por cromatografia de alta eficiência das microalgas *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*.

Quadro 1 - Composição proximal e avaliação da digestibilidade de proteínas *in vitro* das microalgas *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*

Avaliações (% , b.s)	<i>Spirulina</i> LEB-18	<i>Chlorella pyranoidosa</i>
Humidade	11.51±0.04 ^a	6.49±0.09 ^b
Proteína	51.02±0.79 ^a	40.17±1.69 ^b
Cinzas	11.72±0.12 ^a	6.67±0.03 ^b
Lipídios	7.70±0.10 ^a	5.88±0.29 ^b
*Hidratos de carbono	18.05±0.00 ^b	40.79±0.00 ^a
Digestibilidade proteica <i>in vitro</i>	15.68±0.01 ^b	17.00±0.01 ^a

Valores com letras diferentes na mesma linha diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); média (n=3) ± DP; b.s = base seca.

*Cálculo por diferença: HC=100- (H+P+C+L).

HC= Hidratos de carbono

Pode-se observar que os aminoácidos essenciais das proteínas das microalgas *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*, respectivamente com percentuais mais pronunciados, foram Leucina (4.96%; 4.75%), Lisina (2.85%; 4.16%); Valina (3.64%; 3.29%); Fenilalanina (2.61%; 2.81%), Treonina (2.65%; 2.40%) e Isoleucina (2.22%; 2.21%). Já os aminoácidos essenciais com índices químicos menores foram metionina (1.01%; 1.13%) e triptofano (0.77%; 0.46%). A carência em aminoácidos sulfurados e lisina é característica do perfil aminoacídico de algas verdes azuis (Jacob-Lopes *et al.*, 2006; Volkmann *et al.*, 2008), como a *Spirulina*.

Assim os resultados obtidos corroboram os estudos efetuados por Carvajal (2009) sobre a caracterização e modificações químicas da proteína da microlaga *Spirulina máxima* e Habib *et al.* (2008), para a *Spirulina* cultivada na Tailândia e Malásia. Ambos os autores descrevem a leucina como um dos aminoácidos essenciais de maior índice e a metionina e triptofano, com menores índices.

Portanto, de acordo com o Quadro 2 os dados estão conforme as recomendações da FAO/WHO/UNU (1991), para as quantidades necessárias de aminoácidos do adulto, em comparação ao conteúdo de aminoácidos na amostra deste estudo, todos os aminoácidos encontram-se em quantidades maiores que as recomendações nutricionais.

As microalgas têm sido estudadas em pesquisas biotecnológicas devido à sua importância nutricional, econômica e ecológica (Costa *et al.*, 2006). Estudos nutricionais mostram que esses microrganismos têm um dos mais altos teores de proteína já encontrado, boa digestibilidade e todos os aminoácidos essenciais nas proporções recomendadas pela FAO (Avila-Leon, 2010).

No Quadro 2, também se encontra a determinação de proteína das microalgas que foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para termos comparativos com o método Kjeldahl

Quadro 2 - Perfil de aminoácidos das microalgas *Spirulina* Leb-18 e *Chlorella pyrenoidosa*, realizado por cromatografia líquida de alta eficiência

Aminoácidos	<i>Spirulina</i> LEB-18 (mg aminoácido/g de proteína)	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> (mg aminoácido/g de proteína)	Padrão FAO em relação a dieta humana
Ac. Aspártico	5.65	5.01	-
Ac. Glutâmico	9.64	6.76	-
Serina	2.87	2.25	-
Glicina	3.04	3.41	-
Histidina	0.84	1.03	-
Arginina	4.12	3.82	-
Treonina	2.65	2.40	3.40
Alanina	4.69	4.66	-
Prolina	2.19	2.77	-
Tirosina	3.18	2.15	-
Valina	3.64	3.29	3.40
Metionina	1.01	1.13	-
Cistina	0.93	0.85	-
Isoleucina	3.22	2.21	2.80
Leucina	4.96	4.75	6.60
Fenilalanina	2.61	2.81	-
Lisina	2.85	4.16	5.8
Triptofano	0.77	0.46	1.10
Taurina	<0.10	<0.10	-
Proteína total (%)	58.19	56.36	-
Soma de aminoácidos	58.86	53.89	-

(Quadro 1), confirmando o alto conteúdo proteico destas microalgas. Com isso é possível afirmar que a microalga *Spirulina* LEB-18, assim como *Chlorella pyrenoidosa*, ambas tem sido amplamente estudadas devido aos seus altos teores de proteína, contendo todos os aminoácidos essenciais e não essenciais (Quadro 2), para o crescimento humano e saúde, com a presença de metionina, aminoácido ausente na maioria das microalgas e algas (Rodrigues, 2008; Lisboa *et al.*, 2016). As espécies *Spirulina platensis* e *Spirulina máxima* são as mais estudadas para uso na alimentação humana por apresentarem um perfil nutricional que as torna ideais como suplemento alimentar, pois substituem satisfatoriamente as fontes artificiais de nutrientes, por combinar diversos constituintes de maneira equilibrada. Estes constituintes incluem proteínas de alta qualidade, vitaminas do complexo B, minerais, antioxidantes β -caroteno e vitamina E (Ambrosi *et al.*, 2008).

Perfil dos ácidos fenólicos das microalgas

No Quadro 3 estão apresentados os valores de tempos de retenção (t_R), curvas analíticas e correlação dos padrões avaliados. O teor de fenóis individuais e totais dos extratos, avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência, está apresentado no Quadro 4.

De acordo com o Quadro 3 todas as curvas apresentaram valores de correlação que possibilitaram quantificação confiável das amostras na faixa de linearidade determinada no instrumento.

Os métodos cromatográficos são um grupo de técnicas de separação de misturas, de modo que o mesmo instrumento faz a separação dos analitos contidos na amostra e sua quantificação (Douša e Gibala, 2010; Barros *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011). O processo da quantificação funciona, basicamente, pela adsorção do analito de interesse na fase estacionária. O tempo de retenção permite a separação das várias substâncias que compõe a amostra: analito(s) e interferentes. A atividade antioxidante de alimentos é basicamente determinada por compostos fenólicos.

O método cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é bastante sensível e pode ser usado como uma ferramenta valiosa no controle de qualidade para a determinação rápida da atividade antioxidante de uma variedade de produtos incluindo extratos de plantas, alimentos, drogas e formulações

que contenham poliherbais (Chandrasekar *et al.*, 2006).

Conforme o Quadro 4, os ácidos fenólicos encontrados para a microalga *Spirulina* LEB-18, foram ácidos gálico (18.00 $\mu\text{g/g}$), ácido protocatecoico (15.25 $\mu\text{g/g}$) e ácido clorogênico (4.5 $\mu\text{g/g}$), justifica-se a pequena quantidade de ácidos fenólicos presentes devido ao lote de 2013, onde o mesmo foi seco em temperatura elevada, alterando os constituintes fenólicos. Contudo, para o extrato fenólico de *Chlorella pyrenoidosa* foi encontrado apenas o ácido Protocatecoico (9.75 $\mu\text{g/g}$), podendo ser justificado pelas condições de cultivo.

Em pesquisas com *Spirulina platensis* diversos estudos consideram-na uma excelente fonte de ácidos fenólicos, incluindo o ácido cafeico, o ácido clorogênico, salicílico, ácido sináptica, e o ácido trans-cinâmico (Colla *et al.*, 2007); Já Souza *et al.*, (2015), afirma que as concentrações dos ácidos fenólicos presentes em *Spirulina platensis* em extrato bruto determinada por CLAE-UV foram 396; 347; 54.0 e 3.5 para ácido gálico, ácido caféico, ácido salicílico e o ácido trans-cinâmico, respectivamente, totalizando 801 mg/g ácidos fenólicos livres.

De acordo com Souza (2012), durante as determinações do conteúdo total de fenóis são quantificadas todas as substâncias que possuem ao menos um anel fenólico, enquanto que no método por cromatografia líquida são quantificados apenas os compostos possíveis de serem separados e quantificados dentro dos limites de detecção do método adotado.

Para a quantidade de compostos fenólicos totais a concentração foi determinada por espectrofotometria obtendo para cada microalga avaliada 10.92×10^3 $\mu\text{g AGE/g}$ para *Spirulina* LEB-18 e 9.10×10^3 $\mu\text{g AGE/g}$ para *Chlorella Pyrenoidosa*. Esta análise foi baseada na reação dos grupos fenólicos com reagente de Folin-Ciocalteu. As diferenças qualitativas e quantitativas na mesma espécie podem ser devido ao efeito de abióticos e bióticos variáveis, que são determinantes da produção de compostos metabólicos com os extratos fenólicos (Souza *et al.*, 2015).

Hajimahmoodi *et al.* (2010) obtiveram para *Chlorella vulgaris* valores da ordem de 0.02 a 0.49 (mg AGE/g) para a fração hexânica, 0.02 a 3.59 (mg AGE/g) para a fração aceto-etílica e 3.69 a 19.14 (mg AGE/g) para

a fração aquosa. Fato que também demonstra que o conteúdo de compostos fenólicos é fortemente dependente do tipo de solvente extrator.

Li *et al.* (2007) estudaram o conteúdo de fenóis totais e a atividade antioxidante em $\mu\text{mol Trolox/g}$ das microalgas *Chlorella protothecoides*, *Chlorella pyrenoidosa* e *Chlorella vulgaris* em três sistemas de solventes (hexano, acetato de etila e água), encontrando valores de conteúdo fenólico variando de 0.97 a 2.67 (mg AGE/g) para os extratos aquosos; 1.6 a 8.12 (mg

AGE/g) para extratos aceto-etílicos e de 3.12 a 14.35 (mg AGE/g) para os extratos hexânicos.

A quantificação de compostos fenólicos totais de *Chlorella sp.* de acordo com o estudo de Baracho *et al.* (2015), variou de 5 a 12 mg de ácido gálico equivalente (AGE) /g de extrato.

Os resultados de Souza (2012), em seu trabalho para a *Chlorella sp.* também foram inferiores (0.60 mg/g) aos mencionados pelos autores que utilizaram

Quadro 3 - Tempos de retenção, curvas analíticas dos padrões e correlação dos ácidos fenólicos identificados por cromatografia líquida de alta eficiência

Padrão	t_R (minutos)	Curva analítica	R
Ácido gálico	4.96	$y = 75433.68x + 10597.73$	0.98
Ácido Protocatecóico	8.15	$y = 39516.64x - 5851.919$	0.99
Ácido Clorogênico	13.76	$y = 33901.28x + 8508.613$	0.98
Ácido Hidroxibenzoico	14.96	$y = 47770.55x - 40064.28$	0.99
Ácido cafeico	18.45	$y = 101204.0x + 12415.70$	0.98
Ácido Vanilínico	21.52	$y = 77125.93x + 2985.14$	0.98
Ácido Ferúlico	22.66	$y = 70714.05x - 842.986$	0.96

Quadro 4 - Quantificação de fenóis individuais e totais de extratos de microalgas *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa* por cromatografia líquida de alta eficiência

Microalga	Ácido gálico ($\mu\text{g/g}$)	Ácido Protocatecoico ($\mu\text{g/g}$)	Ácido Clorogênico ($\mu\text{g/g}$)	Compostos fenólicos Totais ($\mu\text{g AGE/g}$)
<i>Spirulina</i> LEB-18	18.00	15.25	4.50	10.92×10^3
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	-	9.75	-	9.10×10^3

AGE= equivalente ao ácido gálico.

solventes e condições de cultivo distintas. Como também, Assis *et al.* (2014), encontraram valores inferiores (0.69 mg/g) a este estudo para extratos fenólicos de *Chlorella*.

As cianobactérias ou microalgas também têm sido destaque nas indústrias de alimentos para produção de compostos antioxidantes (Richa *et al.*, 2011). A atividade antioxidante de um determinado extrato pode estar relacionada com o conteúdo de compostos fenólicos totais conforme tem sido demonstrado em vários estudos, como os de Colla *et al.* (2007) e Estrada *et al.* (2001).

Atividade antioxidante

A Figura 1 apresenta a avaliação da atividade antioxidante de extratos de *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa* frente aos radicais DPPH e ABTS, e ao sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Os métodos DPPH e ABTS são caracterizados por excelente reprodutibilidade em condições certas de ensaio, mas eles também mostram diferenças significativas na sua resposta aos antioxidantes (Assis, 2012).

As respostas deste trabalho assemelham-se às de Vieira *et al.* (2009) que obteve a mesmas características

com relação ao solvente metanol em relação à extração dos compostos fenólicos do pó de erva-mate.

Os radicais livres de DPPH, que inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétron livre, perdem esta cor quando um radical hidrogênio doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH, diminuindo a absorvância. O DPPH é um radical estável, com baixa taxa de deterioração e possui reatividade com a maioria dos compostos. Apenas reagentes redutores fortes são capazes de reagir com estes radicais estáveis estequiometricamente. A baixa absorvância indica atividade sequestrante de radicais livres (Santos *et al.*, 2007).

Sudha *et al.* (2011) estudou a atividade antioxidante da amostra *Spirulina platensis* na concentração de 15 mg/ml que exibiu 51.94% da atividade de eliminação de DPPH.

Custódio *et al.* (2012), obteve 35.2% de ASR com a utilização de extratos metanólicos (10 mg/ml) para microalga minutíssima. Assis (2012) encontrou 28.65% de ARS com a utilização de extratos metanólicos na concentração de 8.42 mg/mL para microalga *Chlorella pyrenoidosa*. Estes valores foram superiores aos encontrados neste estudo em diferentes tempos,

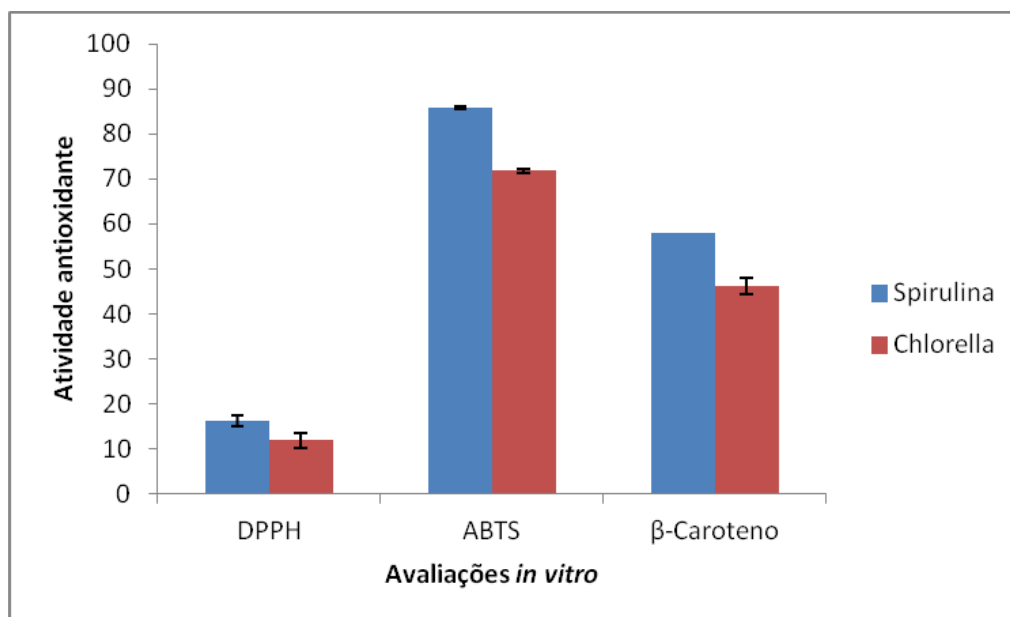


Figura 1 - Atividade antioxidante quanto a captura de radicais DPPH (%), ABTS (μ M Trolox.g⁻¹ de microalga), sistema β -caroteno/ácido linoleico (%) de extratos fenólicos de microalgas *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*.

com a utilização de extratos metanólicos de *Spirulina* LEB-18 e *Chlorella pyrenoidosa*.

Estudos com outras espécies verificaram a capacidade antioxidante de extratos aquosos de várias espécies como cianobactérias que apresentaram percentagens de inibição de DPPH• entre 50-75%, (Shanab *et al.*, 2012). Xia *et al.* (2013) também realizaram um estudo sobre a produção, caracterização e atividade antioxidante pelo método de DPPH de fucoxantina obtida da diatomácea *Odontella aurita* e obtiveram percentagens de inibição de DPPH• entre 15-70% dependendo da concentração de fucoxantina (0.02- 0.2mg/mL). Isto significa que compostos antioxidantes obtidos diversas fontes de microalga são efetivos para captura de radicais. Porém, Cepoi (2009) não encontrou, proporcionalmente, maior atividade sequestradora do radical ABTS•+, na medida em que, aumentou a concentração do solvente em extratos etanólicos de *Spirulina platensis*. Logo, Chu *et al.* (2010) encontraram forte capacidade do extrato aquoso de *Spirulina* em reduzir significativamente a morte celular induzida por radicais livres DPPH e ABTS•+, como também, uma atividade do extrato bruto muito mais elevada do que os compostos bioativos (ficocianina) isoladamente, sugerindo que uma mistura de compostos é mais ativa do que um único composto puro.

O resultado encontrado, em relação à capacidade antioxidante, determinada pelo método ABTS, foi, em média, 71.75 ± 0.49 ($\mu\text{M Trolox.g}^{-1}$ de microalga), para *Chlorella pyrenoidosa* e 85.77 ± 0.29 ($\mu\text{M Trolox.g}^{-1}$ de microalga), para a *Spirulina*.

Segundo Christ-Ribeiro *et al.* (2013), afirmaram que os compostos fenólicos de seu estudo apresentaram para o método de ABTS a inibição de $18 \mu\text{M Trolox.g}^{-1}$ de microalga na concentração de $4.25 \mu\text{g/mL}$ de extrato de microalga *Spirulina* LEB- 18, sendo este valor inferior ao deste estudo, isto pode ser possível devido as variações das condições de produção desta microalga em diferentes épocas do ano.

Pesquisas realizados por Pereira *et al.* (2015), com hidrolisados proteicos de *Chlorella* avaliando a atividade antioxidante frente à captura de radicais livre através dos métodos DPPH e ABTS foram eficazes, ocorrendo um aumento da atividade antioxidante obtendo respectivamente 26.14 e 47.27%.

De acordo com Figura 1, verifica-se que a atividade antioxidante utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoleico, onde o teor de inibição foi maior para extratos fenólicos de *Spirulina*, significando maior capacidade de inibir a peroxidação do ácido linoleico. O β -caroteno é o caroteno mais abundante nos alimentos e o mais interessante economicamente, pois apresenta maior atividade vitamínica (Ambrosio *et al.*, 2006). É o único carotenóide que apresenta dois radicais β -ionona, que ao se romper forma duas moléculas de pró-vitamina A.

Baky *et al.* (2008) encontraram valores de 87.43%, 92.18 e 89.58 para extratos de *Spirulina maxima* (diclorometano:metanol (1:1)), BHT e BHA, respectivamente, quanto à capacidade de inibição da peroxidação lipídica, utilizando o mesmo método.

Um estudo *in vitro* e *in vivo* conduzido com *Spirulina* (*Arthrospira*) revelou a sua ação antioxidante, devido à presença de compostos como ácido fenólico, tocoferóis e β -caroteno nesta microalga, que são conhecidos por exibirem propriedades antioxidantes. Por outro lado, proteção contra o cancro e o envelhecimento tem sido atribuída a compostos bioativos da *Spirulina*, mas a sua ação é mais evidente quando é utilizado todo o extrato da microalga em vez de apenas β -caroteno isoladamente. Isto mostra a possibilidade da existência de efeitos sinérgicos entre os compostos do extrato de *Spirulina* (Miranda *et al.*, 1998).

Pode-se considerar que substâncias naturais são responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante das microalgas *Spirulina* LEB-18 e da *Chlorella pyrenoidosa*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos das microalgas analisados neste estudo apresentaram o elevado teor de proteínas com o perfil completo de aminoácidos, como também a atividade antioxidante significativa, demonstrando possível aplicabilidade de seu emprego como antioxidantes naturais.

AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro a FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL-FAPERGS-Edital 18/2012-PROGRAMA PESQUISADOR VISITANTE SÊNIOR com recursos financeiros e bolsa para Prof^a. Dr^a. Leonor A.

Souza-Soares e bolsa de doutoramento para Adriana Rodrigues Machado e ao CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA-CNPQ, através da bolsa de iniciação científica concedida a Carolina Graça.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abedin, R.M.A. & Taha, H.M. (2008) – Antibacterial and antifungal activity of cyanobacteria and green microalgae, evaluation of medium components by Plackett-Burmann Design for antimicrobial activity of *Spirulina platensis*. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*, vol. 3, n. 1, p. 22-31.
- Ambrosi, M.A.; Reinehr, C.O.; Bertolin, T.E.; Costa, J.A.V. & Colla, L.M. (2008) – Propriedades de saúde de *Spirulina* spp. *Revista de Ciências Farmacêuticas, Básica Aplicada*, vol. 29, n. 2, p. 109-117.
- Ambrosio, C.L.B.; Campos, F.A.C.S. & Faro, Z.P. (2006) – Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. *Revista de Nutrição*, vol. 19, n. 2, p. 233-243. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732006000200010>
- AOAC (2000) – *Official Methods of analysis international*, 17th, CD-ROM, Willian Horwitz. Association of Official Analytical Chemists.
- Assis, L.M. (2012) – *Atividade antioxidante de extratos de microalgas Spirulina LEB-18 e Chlorella pyrenoidosa e estudo da sua nanoencapsulação em lipossomas*. Tese de doutoramento. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, Rio Grande do Sul, 85 p.
- Assis, L.M.; Machado, A.R.; Motta, A.S.; Costa, J.A.V. & Souza-Soares, L.A. (2014) – Development and characterization of nanovesicles containing phenolic compounds of microalgae *Spirulina* strain LEB-18 and *Chlorella pyrenoidosa*. *Advances in Materials Physics and Chemistry*, vol. 4, n. 1, p. 6-12. <http://dx.doi.org/10.4236/amc.2014.41002>
- Avila-Leon, I.A. (2010) – *Estudo do cultivo de Spirulina platensis por processo contínuo com uréia como fonte de nitrogênio*. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 99 p.
- Baky, E.; Hanaa, H.; Baz, E.; Farouk, K.; Baroty, E. & Gamal, S. (2008) – Caracterização de compostos nutracêuticos em azul alga *Spirulina maxima* verde. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 2, n. 10, p. 292-300.
- Belay, A. (2002) – The potential application of *Spirulina* (*Arthrospira*) as a nutritional and therapeutic supplement in health management. *Journal of the American Nutraceutical Association*, vol. 5, n. 2, p. 27-48.
- Barros, L., Dueñas, M., Ferreira, I.C.F.R., Maria C.A. & Santos-Buelga, C. (2011) – Use of HPLC-DAD-ESI/MS to profile phenolic compounds in edible wild greens from Portugal. *Food Chemistry*, vol. 127, n. 1, p. 169-173. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.009>
- Baracho, B.M.; Freitas, J.O.; Costa, K.S.; Bezerra, R.M.; Lima, R.L.; Alencar, D.B.; Pires-Caalcante, K.M.S.; Sampaio, A.H. & Saker-Sampaio, S. (2015) – Atividade antioxidante *in vitro* da *Chlorella* sp. (Chlorophyta), In: *III Simposio brasileiro do potencial energético de microalgas, 16 a 18 de novembro*, Natal, Rio Grande do Norte, 28 p.
- Carvajal, J.C.L. (2009) – *Caracterização e modificações químicas da proteína da microalga Spirulina (Spirulina maxima)*. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 138 p.
- Cepoi, L.; Rudi, L.; Miscu, V.; Cojocari, A.; Chiriac, T. & Sadovnic, D. (2009) – Antioxidative activity of ethanol extracts from *Spirulina platensis* and *Nostoc linckia* measured by various methods. *Analele Universității din Oradea, Fascicula Biologie*. vol. 16, n. 2, p. 43-48.

- Chandrasekar, D.; Madhusudhana, K.; Ramakrishna, S. e Diwan, P.V. (2006) – Determination of DPPH free radical scavenging activity by reversed-phase HPLC: a sensitive screening method for polyherbal formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 40, n. 2, p. 460-464. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpba.2005.07.042>
- Christ-Ribeiro, A.; Graça, C.S.; Moreira, L.M.; Machado, A.R. e Souza-Soares, L.A. (2013) – Atividade Antioxidante de compostos fenólicos extraídos da cianobactéria *Spirulina* cultivada no sul do Brasil. In: *XIV Congresso Argentino de Ciência e Tecnologia*, 1 p.
- Chu, W.L.; Lim, Y.W.; Radhakrishnan, A.K. & Lim, P.E. (2010) – Protective effect of aqueous extract from *Spirulina platensis* against cell death induced by free radicals. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, vol. 10, art. 53. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-10-53>
- Cintra, R.M.G.C.; Magalhães, C.O.; Garcia, R.R.; Mello, R.; Padilha, A.; Kusai, C. & Caetano, L. (2007) – Avaliação da qualidade da proteína de arroz e feijão e de dieta da região sudeste do Brasil. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, vol. 18, n. 3, p. 283-289.
- Colla, L.M.; Badiale-Furlong, E. e Costa, J.A.V. (2007) – Antioxidant properties of *Spirulina* (*Arthrospira*) *platensis* cultivated under different temperatures and nitrogen regimes. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol. 50, n. 1, p. 161-167. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-89132007000100020>
- Costa, J.A.V.; Colla, L.M.; Duarte, P.F.; Kabke, K. & Weber, A. (2002) – Modelling of *Spirulina platensis* growth in fresh water using response surface methodology. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol. 18, n. 7, p. 603-607. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1016822717583>
- Costa, J.A.V.; Colla, L.M. & Duarte Filho, P. (2004) – *Spirulina platensis* growth in open raceway ponds using fresh water supplemented with carbon, nitrogen and metal ions. *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 58, p. 76-80. <http://dx.doi.org/10.1515/znc-2003-1-214>
- Costa, J.A.V.; Morais, M.G.; Dalcanton, F.; Reichert, C.C. & Durante, A.J. (2006) – Simultaneous cultivation of *Spirulina platensis* and the toxigenic cyanobacteria *Microcystis aeruginosa*. *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 61, n. 1-2, p. 105-110. <http://dx.doi.org/10.1515/znc-2006-1-219>
- Custódio, L.; Justo, T.; Silvestre, L.; Barradas, A.; Duarte, C.V.; Pereira, H.; Barreira, L.; Rauter, A.P.; Alberício, F. & Varela, J. (2012) – Microalgae of different phyla display antioxidant, metal chelating and acetylcholinesterase inhibitory activities. *Food Chemistry*, vol. 131, n. 1, p. 134-140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.08.047>
- De Philippis, R. & Vincenzini, M. (1998) – Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Reviews*, vol. 22, n. 3, p. 151-175. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00365.x>
- Douša, M. & Gibala, P. (2010) – Fast HPLC method using ion-pair and hydrophilic interaction liquid chromatography for determination of phenylephrine in pharmaceutical formulations. *Journal of AOAC International*, vol. 93, n. 5, p. 1436-1442.
- Estrada, J.E.P.; Bescós, P.B. & Villar Del Fresno, A.M. (2001) – Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. *Il Farmaco*, vol. 56, n. 5-7, p. 497-500. [http://dx.doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01084-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01084-9)
- FAO/WHO (1991) – Evaluation of protein quality. (Report of the Joint FAO/WHO Expert Consultation on Protein Quality Evaluation). Rome, Food and agriculture organization/World health organization, 66 p.
- Feddern, V.; Furlong, E.B.S. & Soares, L.A. (2007) – Effects of fermentation on the physicochemical and nutritional properties of rice bran. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 27, n. 4, p. 800-804. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612007000400020>
- Habib, M.A.B.; Parvin, M.; Huntington, T.C.; Hasan, M.R. (2008) – A review on culture, production and use of *Spirulina* as food humans and feeds for domestic animals and fish. *FAO Fisheries and Aquaculture Circular*. No. 1034. Rome, FAO, 33 p.

- Hajimahmoodi, M., Faramarzi, M.A., MohammadI, N., Soltani, N., Oveisi, M.R. & Nafissi-Varcheh, N. (2010) – Evaluation of antioxidant properties and total phenolic contents of some strains of microalgae. *Journal Applied Phycology*, vol. 22, p. 43-50. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-009-9424-y>
- Henrikson, R. (1994) – *Microalga Spirulina – Superalimento del futuro*. Ediciones S.A. Urano, Barcelona.
- Herrero, M.; Martín-Álvarez, P.; Señoráns, F.J.; Cifuentes, A. & Ibáñez, E. (2005) – Optimization of accelerated solvent extraction of antioxidants from *Spirulina platensis* microalga. *Food Chemistry*, vol. 93, p. 417-423. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.09.037>
- Jacob-Lopes, E.; Zepka, L.Q.; Queiroz, M.I. & Netto, F.M. (2006) – Caracterização da fração protéica da cianobactéria *Aphanothece microscopica* Nägeli cultivada no efluente da parboilização do arroz. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 26, n. 2, p. 482-488.
- Kralovec, J.A.; Power, M.R.; Liu, F.; Maydanski, E.; Ewart, H.S.; Watson, L.V.; Barrow, C.J. & Lin, T.J. (2005) – An aqueous *Chlorella* extract inhibits IL-5 production by mast cells in vitro and reduces ovalbumin-induced eosinophil infiltration in the airway in mice in vivo. *International Immunopharmacology*, vol. 5, p. 689-698. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2004.11.016>
- Li, H.B.; Cheng, K.W.; Wong, C.C.; Fan, K.W.; Chen, F. & Jiang, Y. (2007) – Evaluation of antioxidant capacity and total phenolic content of different fractions of selected microalgae. *Food Chemistry*, vol. 102, n. 3, p. 771-776. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022>
- Lisboa, C.R.; Pereira, A.M. & Costa, J.A.V. (2016) – Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina* sp. LEB 18. *African Journal of Microbiology Research*, vol. 10, n. 3, p. 79-86. <http://dx.doi.org/10.5897/AJMR2015.7760>
- Lourenço, S.O. (2006) – *Cultivo de Microalgas Marinhas – Principios e Aplicações*. Editora RiMa, São Carlos, 588 p.
- Lourenço, S.O.; Barbarino, E.; De-Paula, J.C.; Pereira, L.O.S. & Lanfer Marquez., U. (2002) – Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research*, vol. 50, n. 3, p. 233-241. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1835.2002.00278.x>
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randallet, R.J. (1951) – Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 193, n. 1, p. 265-275.
- Machado, A.R.; Rodrigues, R.S.; Machado, M.R.G. & Souza-Soares, L.A. (2014) -Influência da *Spirulina* LEB-18 em tamanho nanométrico no metabolismo de ratos fêmeas Wistar. *Revista de Ciências Agrárias*, vol. 37, n. 1, p. 29-36.
- Marco, G.J. (1968) – A rapid method for evaluation of antioxidants. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 45, n. 9, p. 594-598. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02668958>
- Miller, H.E. (1971) – A simplified method for the evaluation of antioxidant. *Journal of the American Oil Chemists Society*, vol. 48, n. 2, p. 91.
- Mira, N.V.M.; Barros, R.M.C.; Schiocchet, M.A.; Noldin J.Á. & Lanfer-Marquez, U.M. (2008) – Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 28, n. 4, p. 994-1002.
- Miranda, M.S.; Cintra, R.G.; Barros, S.B. & Mancini-Filho, J. (1998) – Antioxidant activity of the microalga *Spirulina maxima*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, vol. 31, n. 8, p. 1075-1079. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-879X1998000800007>
- Morais, M.G.; Radmann, E.M.; Andrade, M.R.; Teixeira, G.G.; Bruschi, L.R.F. & Costa, J.A.V. (2009) – Pilot scale semicontinuous production of *Spirulina* biomass in southern Brazil. *Aquaculture*, vol. 294, n. 1-2, p. 60-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2009.05.009>
- Olaizola, M. (2003) – Commercial development of microalgal biotechnology: from the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, vol. 20, n. 4-6, p. 459-466. [http://dx.doi.org/10.1016/S1389-0344\(03\)00076-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00076-5)
- Oliveira, A.C.; Valentim, I.B.; Goulart, M.O.F.; Silva, C.A.; Bechara, E.J.H. & Trevisan, M.T.S. (2009) -Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, vol. 32, n. 3, p. 689-702. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000300013>
- Parisi, A.S.; Younes, S.; Reinehr, C.O & Colla, L.M. (2009) – Avaliação da atividade antibacteriana da microalga *Spirulina platensis*. *Revista Ciências Farmacêuticas, Básica e Aplicada*, vol. 30, n. 3, p. 297-301.
- Pereira, A.M.; Lisboa, C.R. e Costa, J.A.V. (2015) – Atividade antioxidante de peptídeos da biomassa microalgal. In: V Simpósio de bioquímica e biotecnologia. Londrina, Paraná, p. 188-189.

- Pessuto, M.B.; Costa, I.C.; Souza, A.B.; Nicoli, F.M.; Mello, J.C.P.; Petereit, F. & Luftmann, H. (2009) – Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *Química Nova*, vol. 32, n. 2, p. 412-416. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000200027>
- Pignolet, O.; Jubeau, S.; Vaca-Garcia, C.; Michaud, P. (2013) – Highly valuable microalgae: biochemical and topological aspects. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 40, n. 8, p. 781-796. <http://dx.doi.org/10.1007/s10295-013-1281-7>
- Pourali, O.; Asghari, F.S. & Yoshida, H. (2010) – Production of phenolic compounds from rice bran biomass under subcritical water conditions. *Chemical Engineering Journal*, vol. 160, n. 1, p. 259-266. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2010.02.057>
- Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999) – Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorizing assay. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 26, n. 9-10, p. 1231-1237. [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
- Ribani, M.; Bottoli, C.B.G.; Collins, C.H.; Jardim, I.C.S.F. e Melo L.F.C. (2004) – Validação em métodos cromatográficos eletroforéticos. *Química Nova*, vol. 27, n. 5, p. 771-780. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422004000500017>
- Richa, R.P.; Rastogi, S.; Kumari, K.L.; Singh, V.K.; Kannaujiya, G.; Singh, M. & Kesheri, R.P. (2011) – Biotechnological potential of mycosporine-like amino acids and phycobiliproteins of cyanobacterial. *Biotechnology, Bioinformatics and Bioengineering*, vol. 1, n. 2, p. 159-171.
- Rodrigues, M.S. (2008) – Avaliação do cultivo de *Spirulina platensis* utilizando simultaneamente nitrato de potássio e cloreto de amônio como fonte de nitrogênio. Dissertação de mestrado em Farmácia. Faculdade de São Paulo, 78 p.
- Santos, M.H.; Batista, B.L.; Duarte, S.M.S. & Lemos, B. (2007) – Influence of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee (*Coffea arabica*). *Química Nova*, vol. 30, n. 3, p. 604-610. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000300020>
- Schmidt, C.G.; Gonçalves, L.M.; Prietto, L.; Hackbart, H. & Furlong, E.B. (2014) – Antioxidant activity and enzyme inhibition of phenolic acids from fermented rice bran with fungus *Rizhopus oryzae*. *Food Chemistry*, vol. 146, p. 371-377. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.101>
- Sgarbieri, V.C. (1987) – Alimentação e nutrição fator de saúde e desenvolvimento. UNICAMP, Campinas, 19 p.
- Sgarbieri, V.C. (1996) – Proteína em alimentos protéicos-propriedades-degradações-modificações. Varela, São Paulo, 517 p.
- Shanab, S.M.M.; Mostafa, S.S.M.; Shalaby, E.A. & Mahmoud, G.I. (2012) – Aqueous extracts of microalgae exhibit antioxidant and anticancer activities. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, vol. 2, n. 8, p. 608-615. [http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60106-3](http://dx.doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60106-3)
- Souza, M.M.; Oliveira, M.S.; Rocha, M. & Furlong, E.B. (2010) – Antifungal activity evaluation in phenolic extracts from onion, rice bran, and *Chlorella phyrenoidosa*. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 30, n. 3, p. 680-685. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612010000300018>
- Souza, M.M.; Prietto, L.; Ribeiro, A.C.; Souza, T.D. & Badiale-Furlong, E. (2011) – Assessment of the antifungal activity of *Spirulina platensis* phenolic extract against *Aspergillus flavus*. *Ciência e Agrotecnologia*, vol. 35, n. 6, p. 1050-1058. <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542011000600003>
- Souza, T.D.; Prietto, L.; Souza, M.M. & Furlong, E.B. (2015) – Profile, antioxidant potential, and applicability of phenolic compounds extracted from *Spirulina platensis*. *African Journal of Biotechnology*, vol. 14, n. 41, p. 2903-2909. <http://dx.doi.org/10.5897/AJB2015.14926>
- Souza, M.M. (2012) – Potencial antifúngico, antioxidante e inibidor da síntese de aflatoxinas dos extratos fenólicos de *Chlorella* sp. e *Spirulina platensis*. Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, Rio Grande do Sul, 180 p.
- Sudha, S.S.; Karthic, R.; Rengaramanujam, J. & Athulya (2011) – Antimicrobial activity of *Spirulina platensis* and *Aphanothece* sp. on selected clinical bacterial isolates and its Antioxidant activity. *South Asian Journal of Biological Sciences*, vol. 1, n. 2, p. 87-98.
- Tantawy, S.T.A. (2011) – Biological potential of cyanobacterial metabolites against some soil pathogenic fungi. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, vol. 9, n. 1, p. 663-666.
- Tomaselli, L. (1997) – Morphology, ultrastructure and taxonomy of *Arthrospira* (*Spirulina*). In: *Spirulina platensis* (*Arthrospira*). Physiology, cell-biology and biotechnology. (Vonshak, A., Ed.) – Taylor & Francis, London.

- Varandas, R.C.R. ; Araújo, V.B.S. ; Silva, V.M.B.; Souza, A.A.; Sassi, K.K.B.; Sassi, P.G.P.; Almeida, P.M.; Lira, E.B.; Nonato, N.S.; Conceição, M. M.; Sassi, C.F.C.; Sassi, R.; Duarte, R.T.; Santana, J.K.S.; Tibucio, V.P. & Silva, J.A. (2015) – Teores de lipídios, proteína e carboidrato em *Chlorella* sp. (D358WC/CMUFPB). In: III Simposio brasileiro do potencial energético de microalgas, 16 a 18 de novembro, Natal, Rio Grande do Norte.
- Vieira, M.A.; Maraschinb, M.; Pagliosac, C.M.; Podestád, R. & Ambonie, R.D.M.C. (2009) – Análise de compostos fenólicos, metilxantinas, tanino e atividade antioxidante de resíduo do processamento da erva-mate: uma nova fonte potencial de antioxidantes. In: *Advances in Cleaner Production*, 2nd International Workshop. 20-22 may 2009, São Paulo, Brazil. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- Volkman, H.; Imianovsky, U.; Oliveira, J.L.B. e Ernani, S.S. (2008) – Cultivation of *Arthrospira* (*Spirulina*) *Platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 39, n. 1, p. 98-101. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000100022>
- Xia, S.; Wang, K.; Wan, L.; Li, A.; Hu, Q. & Zhang, C. (2013) – Production, characterization, and antioxidant activity of fucoxanthin from the marine diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs*, vol. 11, n. 7, p. 2667-2681. <http://dx.doi.org/10.3390/md11072667>
- Zhang, C.-P.; Zheng, H.-Q.; Liu, G. & Hu, F.L. (2011) – Development and validation of HPLC method for determination of salicin in poplar buds: Application for screening of counterfeit propolis. *Food Chemistry*, vol. 127, n. 1, p. 345-350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.014>
- Zhou, G.F.; Sun, Y.; Xin, H.; Zhang, Y.; Li, Z. e Xu, Z. (2004) – “In vivo” antitumor and immunomodulation activities of different molecular weight lambda-carrageenans from *Chondrus ocellatus*. *Pharmacology Research*, vol. 50, n. 1, p. 47-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2003.12.002>