

Influência da *Spirulina* LEB-18 em tamanho nanométrico no metabolismo de ratos fêmeas Wistar

Influence of the cyanobacteria *Spirulina* LEB 18 in metabolism of female Wistar rats

Adriana R. Machado¹, Rosane S. Rodrigues², Mirian R. G. Machado² e Leonor A. Souza-Soares¹

¹ 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-mails: adriana.rodriguesmachado@yahoo.com.br, author for correspondence; leonor.souza-soares@gmail.com

² Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Química de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. CEP 96010-900, Campus Capão do Leão s/n, prédio 4, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. E-mails: rosane.rodrigues@ufpel.tche.br; miriangalvao@gmail.com

Recebido/Received: 2013.09.16

Aceitação/Accepted: 2013.12.15

RESUMO

Objetivo do estudo consistiu em avaliar a influência de dietas contendo *Spirulina* LEB-18 em tamanhos micrométrico e nanométrico no metabolismo de ratos Wistar/UFPel. As ratas foram divididas em quatro grupos (n=6) e alimentadas por 15 dias com as dietas (20g/dia): Controle à base de caseína (C), *Spirulina* à base de *Spirulina* micrométrica (Sma), *Spirulina* nanométrica (Sna) e aprroteica (Aa). Para determinação dos indicadores biológicos da proteína utilizaram-se a Retenção Protéica Líquida (RPL) e o Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA). Ao final do ensaio os animais foram eutanasiados por decapitação e o sangue coletado para análises de hemograma e obtenção do soro (determinação de colesterol total e triacilgliceróis). As dietas contendo *Spirulina* cepa LEB-18 nos tamanhos micrométrico e nanométrico foram eficientes no crescimento, não interferindo no metabolismo e apresentando respostas semelhantes à dieta controle contendo caseína (C).

Palavras-chave: Nanopartícula, *Rattus norvegicus*, *Spirulina*

ABSTRACT

Aim of the study was to investigate the influence of diets containing *Spirulina* LEB-18 micrometer and nanometer size in the metabolism of Wistar/UFPel. The rats were divided into four groups (n = 6) and fed for 15 days with diets (20g/day): Control based on casein (C), *Spirulina* based *Spirulina*-micrometer (Sma), *Spirulina* nanometer (Sna) and aprroteic (Aa). To determine the biological indicators of protein used to Net Protein Retention (NPR or RPL) and Food Efficiency Coefficient (CEA). At the end of the experiment the animals were euthanized by decapitation and blood was collected for analysis of blood test and obtained serum (determination of total cholesterol and triglycerides). Therefore diets containing *Spirulina* strain LEB-18 in micrometer and nanometer sizes were efficient growth, not interfering with the metabolism and presenting answers similar to the control diet containing casein (C).

Keywords: Nanoparticle, *Rattus norvegicus*, *Spirulina*

Introdução

As microalgas são microrganismos heterogêneos, usualmente microscópicos, unicelulares, coloniais ou filamentosos, coloridos e fotoautotróficos. Filogeneticamente podem ser procarióticos ou eucarióticos (Olaizola, 2003). O cultivo de microalgas está crescendo gradativamente e a biomassa produzida destina-se às mais diversas aplicações como produção de proteína unicelular, lipídios, carotenóides, clorofila, enzimas, ésteres, antibióticos, hidrocarbo-

netos e vitaminas (Durand-Chastel *et al.*, 1980; Becker, 1994; Pulz e Gross, 2004; Richmond, 2004).

A *Spirulina* é uma microalga que se destaca por sua composição química, com alta qualidade e quantidade de proteínas, aminoácidos essenciais, minerais, ácidos gordos poliinsaturados e vitaminas. Além disso, apresenta compostos fenólicos (ácidos cafeico, clorogênico, salicílico, trans-cinâmico), tocoferol e pigmentos (carotenóides, ficocianina e clorofila), aos quais são atribuídas suas propriedades potencialmente funcionais (Parisi *et al.*, 2009), mais

especificamente a redução do risco da ocorrência de distúrbios fisiológicos como diabetes, artrite, anemia, desnutrição, obesidade, tensão pré-menstrual, doenças cardiovasculares (Ambrosi *et al.*, 2008) e alguns tipos de câncer. Neste último a ação da microalga parece estar associada à presença de β -caroteno, precursor da vitamina A, o qual apresenta capacidade de controlar a diferenciação e proliferação celulares nos epitélios (Colla *et al.*, 2008), ocorrência usual em cânceres. Nas condições usuais nas quais a microalga é aplicada aos alimentos não apresenta toxicidade para seres humanos e nem prejuízos para o desenvolvimento de órgãos e tecidos, quando utilizada nos limites estipulados pela legislação. A indicação da segurança de uso, associado às evidências de ação fisiológica e a composição química têm estimulado diversas outras pesquisas para a avaliação nutricional e funcional da *Spirulina* (Ambrosi *et al.*, 2008; Colla *et al.*, 2008; Moreira *et al.*, 2011). Sua aplicação em alimentos é basicamente na forma de biomassa seca sendo recebida em *pellets* e triturada em moinho de bolas, peneirada em agitador de peneiras, alcançando uma granulometria de aproximadamente 30 a 40 mesh, respectivamente (0,600 e 0,400 mm).

Considerando o alto valor nutricional e funcional da *Spirulina*, a redução de seu tamanho pode melhorar a absorção destes componentes no organismo, modificando-os. A nanotecnologia tem sido um auxílio potencial aos avanços na produção de alimentos de qualidade melhorada com propriedades funcionais (Cushen *et al.*, 2012). A nanotecnologia é focada em caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas (Sahoo *et al.*, 2007) na escala nanométrica. Estruturas nessa escala apresentam propriedades funcionais únicas não encontradas na escala macro (Chau *et al.*, 2007). Uma das possíveis vantagens da utilização dessas nanopartículas em alimentos está relacionada com a facilidade de atingir órgãos, auxiliando os efeitos nutricionais e funcionais quando comparado com o material em tamanho macrométrico. O objetivo do estudo foi verificar o efeito de dietas contendo *Spirulina* nos tamanhos micrométrico e nanométrico no metabolismo de ratas cepa Wistar/UFPeL.

Material e métodos

Obtenção da matéria-prima

A biomassa da microalga *Spirulina* (LEB cepa-18) foi fornecida pelo Laboratório de Engenharia Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande,

isolada da lagoa Mangueira (33° 30' 133 S, 53° 08' 593 O), localizada em Santa Vitória do Palmar, RS, Brasil (Morais e Costa 2008) e suplementada com 20% do meio Zarrouk (Costa *et al.*, 2004). A biomassa foi fornecida seca em forma de *pellets*, sendo posteriormente triturada em moinho de bolas (Modelo Q298-2) e peneirada em agitador de peneiras, 200 mesh, para homogeneização do tamanho das partículas, alcançando uma granulometria de 88 μ m. A biomassa em forma de pó foi acondicionada à vácuo em embalagens de polietileno de alta densidade (PEAD), com capacidade para 500 g, e armazenada sob refrigeração à temperatura de $\pm 7^\circ\text{C}$ até o momento da realização das análises.

Animais

Foram utilizados 24 ratos fêmeas da espécie *Rattus norvegicus*, cepa Wistar/UFPeL, desmamados aos 21 dias de vida e com peso médio em torno de 57,97 g. Os animais foram divididos em quatro grupos (n=6): Controle com dieta à base de caseína (C); apteico (Aa); *Spirulina* micrométrica (Sma) com dieta à base de *Spirulina* em tamanho micrométrico (1×10^{-6} μ m); e *Spirulina* nanométrica (Sna) com dieta à base de *Spirulina* em tamanho nanométrico (1×10^{-9} nm). As dietas isocalóricas foram fornecidas em 20g/dia e água *ad libitum*, durante 15 dias. Os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais, em ambiente com temperatura constante ($24^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$), troca de ar por exaustão a cada 12h e iluminação adequada (ciclo claro e escuro de 12 horas). Todos os procedimentos experimentais obedeceram às normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal –COBEA (1991) e da Comissão de Ética e Experimentação Animal - CEEA da Universidade Federal de Pelotas (Registro do protocolo nº23110.000978/2010-91).

Preparo das dietas

As dietas foram balanceadas segundo as recomendações de Reeves *et al.* (1993) e preparadas para apresentarem teores em torno de 12% de proteína para se adequarem à metodologia utilizada (Quadro 1).

Transformação da *Spirulina* LEB-18 em *Spirulina* nanométrica

A *Spirulina* foi reduzida ao tamanho nanométrico segundo metodologia proposta por Malheiros *et al.* (2010), com modificações, na qual foram tomados 4g de *Spirulina* (LEB-18), em tamanho micrométrico dissolvidos em 100 mL de solução tampão fosfato na concentração 0,2 M, pH 7,0, procedendo-se o aquecimento do balão a 60°C em banho-maria, e agitação em vórtex. Em seguida a mistura foi conduzida ao

Quadro 1 – Formulação das dietas controle de caseína (C), aprroteica (Aa) e dietas experimentais *Spirulina* micrométrica (Sma) e *Spirulina* nanométrica (Sna) e seus teores protéicos (%)

Ingredientes	Dieta (g kg ⁻¹)			
	C (15,59)**	Aa (1,45)**	Sma (15,25)**	Sna* (10,76)**
<i>Spirulina</i> micrométrica	–	–	200	–
<i>Spirulina</i> nanométrica	–	–	–	80
Caseína	200	–	–	80
Óleo de soja	70	70	70	70
Mistura mineral	35	35	35	35
Mistura vitamínica	10	10	10	10
L-cistina	3,0	3,0	3,0	3,0
Bitartarato de Colina	2,5	2,5	2,5	2,5
Sacarose	100	100	100	100
Fibra de trigo	50	50	50	50
Amido de milho	529,5	729,5	529,5	569,5

* A dieta *Spirulina* nanométrica foi adicionada de caseína para elevar seu teor protéico .

** Teor protéico das dietas formuladas (%)

ultra turrax para homogeneização das partículas, a 10000 rpm, por 20 minutos.

Avaliações biológicas, nutricionais e bioquímicas

Para determinação dos indicadores biológicos e nutricionais da proteína utilizaram-se os testes de Retenção Protéica Líquida (RPL) e o Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA), após 15 dias (Sgarbieri, 1996).

Retenção Proteica Líquida (RPL) ou Quociente de Eficiência Líquida (NPR)

A Retenção Protéica Líquida (RPL) é uma modificação do PER (Quociente de Eficiência Protéica). Tem a duração de 15 dias e utiliza, além das dietas a serem testadas, um controle negativo (dieta aprroteica) e um positivo (dieta à base de caseína ou padrão). O RPL foi calculado de acordo com Bender e Doell (1957a;b):

$$RPL = \frac{\text{Ganho de peso (g) do grupo teste} + \text{perda de peso do grupo aprroteico}}{\text{Consumo de proteína do grupo teste}}$$

Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA): O ganho de peso e a ingestão de dieta por animal foram utilizados para determinar o coeficiente de eficiência alimentar (CEA).

No final do ensaio, os animais foram eutanasiados por decapitação e a coleta sanguínea realizada de duas formas: a) 1 mL do sangue foi disposto em eppendorf com anticoagulante EDTA e destinado para análise de hemograma em contador hematólogo automático (POCH-100IVDIFF, SYSMEX); e b) o restante centrifugado a 1000 g por 15 minutos a 4 °C em tubos de ensaio para obtenção do soro, o qual foi armazenado a -18 °C para posterior análise de colesterol total e triacilgliceróis em equipamento automatizado LabMax 240 (LABTEST DIAGNÓSTICA S.A.).

Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo programa Estatística, versão 7.0 (Estatística, 2004), sendo realizada a análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey (p<0,05) para a comparação das médias.

Resultados e discussão

O Quadro 2 apresenta as respostas nutricionais dos ratos fêmeas cepa Wistar/UFPEL submetidos às diferentes dietas experimentais, durante 15 dias.

Verificou-se que não ocorreram alterações no peso corporal dos animais alimentados com dietas à base de *Spirulina* (Sma e Sna) quando comparados com o grupo controle. Os valores de ingestão protéica foram também semelhantes entre as duas condições nutricionais (controle e Sma), no qual ambas diferiram ($p \leq 0,05$) da *Spirulina* nanométrica, porém indicando que esta fonte alternativa de proteína proveniente de biomassa não comprometeu o crescimento de animais. Estes resultados corroboram o estudo de Tranquille *et al.* (1994) que compararam dietas à base de *Spirulina* e caseína e *Spirulina* em *pellet* e de Rogatto *et al.* (2004) com uma dieta com 17% de *Spirulina* em substituição total à proteína da dieta controle (caseína) em ratos machos jovens *Wistar*, nos quais ambos verificaram que a *Spirulina* não causou prejuízo no crescimento dos roedores.

Os animais alimentados com as dietas estudadas não diferiram estatisticamente em relação ao coeficiente de eficiência alimentar (CEA), estando o valor próximo ao obtido por Chaud *et al.* (2008) que foi de 0,30. Conforme estes autores, a redução da eficiência alimentar ocorre devido à diminuição metabólica do organismo frente à determinada dieta, causando estagnação ou redução do peso corporal. O RPL é a técnica utilizada para avaliar a qualidade da proteína de um alimento em relação ao padrão de caseína. O grupo que recebeu a *Spirulina* nanométrica diferiu ($p \leq 0,05$) dos demais em relação a este parâmetro. Gomes *et al.* (2000), em trabalho com ratos, encontraram valores de RPL de 4,70 para

caseína, 2,70 para farelo de soja não tratado com biperidílios, 2,60 para o tratado e 3,70 para o mesmo produto peletizado e tratado. Já Souza *et al.* (2000), em estudo sobre síntese e caracterização nutricional de plasteína obtida da proteína da folha de mandioca, da soja, e do soro de queijo, obtiveram para caseína 4,03 e sobrenadante plasteína 3,80 e plasteína precipitada 3,75, valores abaixo do encontrado neste estudo com *Spirulina*.

Nos Quadros 3 e 4, respectivamente, estão os dados das avaliações hematológicas e de colesterol total e triacilgliceróis de ratas *wistar* submetidas às diferentes dietas.

Ao relacionarem-se as quantidades médias de proteínas consumidas pelos ratos durante 15 dias, vê-se que, apesar das quantidades diferirem estatisticamente entre os grupos, o mesmo não ocorreu nas repostas dos parâmetros hematológicos dos ratos. Pode-se interpretar que embora haja diferença em alguns parâmetros nutricionais onde são computados, consumo, ganhos de peso e perdas de peso (Quadro 2) as respostas dos parâmetros hematológicos indicam que o metabolismo protéico permaneceu inalterado neste período de 15 dias.

Os grupos que consumiram as diferentes dietas não diferiram ($p > 0,05$) em relação ao hematócrito (Ht) que resulta da proporção entre o volume dos eritrócitos e do sangue total, sendo expresso como uma porcentagem (%) do sangue total. De acordo com Miller (1993) o valor de hematócrito é fundamental no estudo de todos os tipos de anemia, além disso, seus resultados estão menos sujeitos a erros do que a contagem de hemácias. Os níveis de hematócrito em todos os grupos estão de acordo com outros estudos cujos valores variam entre 36 e 48% (Harkness e Wagner, 1993; Boaventura *et al.*, 2003; Duarte *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2011).

Quadro 2 – Avaliações do ganho e perda de peso, Proteína consumida, Coeficiente de Eficiência Alimentar (CEA) e Retenção Protéica Líquida (RPL) em ratos fêmeas cepa Wistar/UFPEL, alimentados com as dietas controle de caseína (C), aprroteica (Aa), *Spirulina* micrométrica (Sma) e *Spirulina* nanométrica (Sna) durante 15 dias

Dietas	Ganho de peso (g)*	Perda de peso (g) do grupo aprótico	Proteína consumida (%)	CEA	RPL
C	77,00 ± 5,33 ^a	-	15,59 ± 0,28 ^a	0,37 ± 0,01 ^a	5,77 ^b
Aa	21,00 ± 16,09 ^b	13,00	1,45 ± 0,10 ^c	0,16 ± 0,02 ^c	-
Sma	64,86 ± 5,54 ^a	-	15,25 ± 0,29 ^a	0,31 ± 0,03 ^b	5,10 ^b
Sna	76,86 ± 11,65 ^a	-	10,76 ± 0,20 ^b	0,33 ± 0,04 ^{a, b}	8,35 ^a

Média de seis ratos por dieta ± desvio padrão. Letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$). *(PF-PI=Peso final – Peso inicial).

Quadro 3 – Proteínas consumidas (%) e parâmetros hematológicos em ratos fêmeas cepa Wistar/UFPel, alimentados com dieta Controle de caseína (C), apteica (Aa), *Spirulina* micrométrica (Sma) e *Spirulina* nanométrica (Sna) durante 15 dias

Dietas	Proteína consumida (%)	Indicadores					
		Hematócrito (%)	Hemoglobina (g.dL ⁻¹)	Albumina (g.dL ⁻¹)	Proteínas totais (g.dL ⁻¹)	Eritrócitos (10 ⁶ /mm ³)	Basófilos (%)
C	15,59±0,28 ^a	39,76±2,20 ^a	12,90±0,84 ^a	3,32±0,16 ^a	6,12±0,31 ^a	7,06±0,25 ^a	0
Aa	1,45±0,10 ^c	38,6±2,83 ^a	12,66±1,34 ^a	3,13±1,82 ^a	6,12±13,93 ^a	7,13±0,64 ^a	0
Sma	15,25±0,29 ^a	39,58±1,78 ^a	12,84±0,66 ^a	3,30±0,15 ^a	5,72±0,18 ^a	7,08±0,42 ^a	0
Sna	10,76±0,20 ^b	41,1±3,18 ^a	13,58±1,34 ^a	3,22±0,095 ^a	5,92±0,29 ^a	7,49±0,32 ^a	0

Média de seis ratos por dieta ± desvio padrão. Letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

Os valores de hemoglobina para roedores oscilam de 11 a 18% (Harkness e Wagner, 1993), também neste estudo onde os grupos não diferiram entre si, e cujos valores aproximam-se dos encontrados por Verruma-Bernardi *et al.* (2009). A albumina plasmática é boa indicadora do estado nutricional e, neste caso, os valores obtidos nesta pesquisa apresentam-se dentro dos padrões de normalidade para a espécie em estudo (Souza-Soares *et al.*, 2009). Santos *et al.* (2004) encontraram 3,01 g dL⁻¹ de albumina para a dieta caseína e 2,68 g dL⁻¹ para dieta suplementada com multimistura, estando este valor próximo aos deste estudo. Conforme a literatura, ratos saudáveis possuem teor de albumina na faixa de 3,4 a 4,3 g dL⁻¹ (Souza-Soares *et al.*, 2009). Com relação às proteínas totais (5,72-6,12 g dL⁻¹), não houve diferença significativa entre os grupos. Uma dieta creche suplementada com multimistura apresentou proteínas totais inferiores a este estudo, no qual encontraram valores de 4,48 g dL⁻¹ e para dieta caseína 5,53 g dL⁻¹ (Santos *et al.*, 2004). Os eritrócitos apresentaram valores de acordo com Souza-Soares *et al.* (2009), de 7 a 10 milhões/mm³ de eritrócitos. Os eritrócitos ou hemácias são os elementos figurados presentes em maiores quantida-

des no sangue e sua baixa contagem indica deficiência em ferro e estado anêmico.

Os basófilos desempenham papel importante nas respostas imunitárias corporais, pois ao menor contato com uma substância alergênica liberam mediadores químicos, como a histamina, a qual atrai as demais células de defesa (Miller, 1993). Em ratos são raros ou poucos; sendo esta escassez circulante uma característica para a classe dos mamíferos, de uma forma geral (Messias, 2009). Souza-Soares *et al.* (2009) e Anthony *et al.* (2006) preconizam como valores normais a faixa entre 0 e 1% de basófilos, os quais não foram detectados nos animais em estudo demonstrando que, nas doses utilizadas (4 g de *spirulina* micrométrica e 1,6 g de *spirulina* nanométrica correspondendo a 20 g de dieta por/dia), a *Spirulina* tanto no tamanho micrométrico como nanométrico não induz a uma imuno-resposta.

Os grupos em estudo não diferiram significativamente para colesterol total e para triacilgliceróis indicando que a *Spirulina* LEB-18, em diferentes tamanhos, não interferiu nos parâmetros avaliados. Melo *et al.* (2008), em suas dietas experimentais com farinha de folhas de mandioca obtiveram valores

Quadro 4 – Perfil lipídico em ratos fêmeas cepa Wistar/UFPel, alimentados com dieta controle caseína (C), apteica (Aa), *Spirulina* micrométrica (Sma) e *Spirulina* nanométrica (Sna) durante 15 dias

Dietas	Colesterol total (mg dL ⁻¹)	Triacilgliceróis (mg dL ⁻¹)
C	77,66±10,87 ^a	73,00 ±20,67 ^a
Aa	38,33±33,92 ^b	99,00±29,54 ^a
Sma	93,16±10,11 ^a	80,66±25,35 ^a
Sna	83,50±13,22 ^a	70,00±22,29 ^a

Média de seis ratos por dieta ± desvio padrão. Letras distintas na mesma coluna diferem significativamente entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

próximos aos deste estudo para colesterol total e triacilgliceróis, também utilizando ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem Wistar.

Marco (2008) no estudo com animais que consumiram uma multimistura com adição de farelo de arroz e *Spirulina* encontrou 64,5 mg dL⁻¹ de colesterol, valor abaixo deste estudo. A faixa considerada normal para a espécie, contudo, é variável na literatura, onde são relatados valores entre 20 e 120 mg dL⁻¹ (Canadian Council on Animal Care, 1993; Harkness e Wagner, 1993; Dantas *et al.*, 2006; Centro de Bioterismo da FMUSP, 2008; Souza-Soares *et al.*, 2009). Apesar dos resultados citados, ratos são bastante resistentes em desenvolver hipercolesterolemia e aterosclerose, possivelmente em razão do aumento na conversão de colesterol em ácidos biliares no fígado (Machado *et al.*, 2003).

Alguns estudos abordam a redução da hipercolesterolemia pelo consumo de *Spirulina*. O primeiro relato de redução de colesterol sérico pela ingestão de *S. platensis* foi feito em ratos por Devi e Venkataraman (1983). Desde então, diversos pesquisadores confirmaram esta descoberta em experimentos com animais e seres humanos. Em estudo feito por Kato *et al.* (1984) em ratos, os níveis de colesterol total e fosfolípidios séricos foram aumentados através de uma dieta contendo 1% de colesterol. Estes níveis elevados foram claramente reduzidos com a introdução de 16% de *S. platensis* à dieta anterior (Kato *et al.*, 1984; Belay *et al.*, 1993; Ambrosi *et al.*, 2008).

Os grupos não diferiram ($p > 0,5$) em relação aos triacilgliceróis e os valores resultantes das dietas Sma e Sna foram próximos aos encontrados por Moreira (2010), de 66 a 78 mg dL⁻¹, em sua pesquisa sobre efeito de diferentes concentrações de *Spirulina* LEB 18 nos perfis bioquímico, hematológico e nutricional de ratos Wistar nutridos e desnutridos. Na literatura são citados valores entre 26 e 110 mg dL⁻¹ para este parâmetro (Harkness e Wagner, 1993; Dantas *et al.*, 2006; Centro de Bioterismo da FMUSP, 2008; Souza-Soares *et al.*, 2009). Tal variação está relacionada ao fato de que os triacilgliceróis constituem a reserva energética dos animais e sua concentração varia em função do consumo e armazenamento de todo o excesso de nutrientes, seja carboidrato, proteína ou o próprio lipídio (Vaz *et al.*, 2006).

Conclusões

A *Spirulina* nos tamanhos micrométrico e nanométrico foi capaz de promover o crescimento das ratas, sem interferência no metabolismo das mesmas, alcançando resultados comparáveis à caseína.

Referências bibliográficas

- Ambrosi M. A.; Reinehr C.O.; Bertolin T.E.; Costa J.A.V. e Colla L. M. (2008) - Propriedades de saúde da microalga *Spirulina*. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, vol. 29, n. 2, p.115-123.
- Anthony, J.C.M.; Merriman T.N. e Heimbach, J.T. (2006) - 90-Day oral (gavage) study in rats with galactooligosaccharides syrup. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 44, n. 6, p. 819-826.
- Becker, E. W. (1994) - *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press, 301 p.
- Belay, A.; Ota, Y.; Miyakawa K. e Shimamatsu, H. (1993) - Current knowledge on potential health benefits of *Spirulina*. *J. Appl. Phycol.*, vol. 5, n. 2, p. 235-241.
- Bender, A.E. e Doell, B.H. (1957b) - Note on the determination of net protein utilization by carcass analysis. *Br. J. Nutr.*, vol. 11, n. 1, p. 138-143.
- Bender, A.E. e Doell, B.H. (1957a) - Biological evaluation of protein. *Br. J. Nutr.*, vol. 11, n. 1, p. 140-148.
- Boaventura, G.; Silva R.H.L.; Tostes, L.F. e Azeredo, V.B. (2003) - Ganho de peso, hemoglobina e hematócrito de ratos recebendo dieta de Quissamã, RJ, com ou sem suplemento alimentar alternativo. *Rev. Nutr.*, vol. 16, n. 3, p. 321-331.
- Canadian Council on Animal Care (1993) - *Guide to the care and use of experimental animals*. vol 1, 2ª Ed, 298p.
- CENTRO DE BIOTERISMO DA FMUSP. Parâmetros bioquímicos de ratos do centro de bioterismo da FMUSP, 2008. [Em linha]: citado em 11/07/2013, Disponível em http://www.biot.fm.usp.br/index.php?pg=03.00.00&tip=RATO&id_ani=17¶metros=sim.
- Chau, C-F.; Wu, S-H. e Yen, G-C. (2007) - The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 18, n. 5, p. 269-280.
- Chaud, S.G.; Sgarbieri, V.C. e Vicente E. (2008) - Influência de frações da parede celular da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) sobre alguns parâmetros nutricionais de ratos em crescimento. *Revista de Nutrição*, vol. 21, n. 2, p. 137-147.
- COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) (1991) - Princípios Éticos na Experimentação Animal - Editado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) em junho de 1991.
- Colla, L.M, Muccillo-Baisch, A.L e Costa, J.V. (2008) - *Spirulina platensis* effects on the levels of total cholesterol, HDL and triacylglycerols in rabbits

- fed with a hypercholesterolemic diet. *Braz Arch Biol Technol*; vol. 51, n. 2, p. 405-411.
- Costa, J.A.V.; Colla, L.M. e Duarte Filho, P.F. (2004) - Improving *Spirulina platensis* Biomass Yield Using A Fed-Batch Process. *Bioresource Technology*, vol. 92, n.3, p. 237-241.
- Cushen, M.; Kerry, J.; Morris, M.; Cruz-Romero M. e Cummins E. (2012) - Nanotechnologies in the food industry e Recent developments, risks and regulation. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 24, n. 1, p. 30 - 46
- Dantas, J.A.; Ambiel, C.R.; Cuman, R.K.N.; Baroni, S.; Bersani-Amado, C.A. (2006). Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. *Revista Acta Sci Health Sci.*, vol. 28, n. 2, p. 165-170 .
- Devi, M.A. e Venkataraman, L.V. (1983) - Hypocholesteremic effect of blue-green algae *Spirulina platensis* in albino rats. *Nutr Rep Int*; vol. 28, p. 519-530.
- Duarte, A.L.L.; Cattelan, J.W.; Araújo, M G.; Cattelan, R.J.G.; Malheiros, E.B. e Vicente, W.R.R. (2009) - Hemogram and blood biochemistry of goats submitted to videolaparoscopic guided hepatic biopsy with tru-cut needle. *ARS Veterinaria*, vol. 25, n. 2, p. 47-53.
- Durand-Chastel, H. Shelef, G. e Soeder, C.J. (1980) - Production and use of *Spirulina* in México. In: *Algae biomass*. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, p.51-64.
- Gomes, J.C.; Magalhães, E.C.S. e Pereira, C.A.S. (2000). Avaliação do efeito de bipiri (paraquat) em culturas de soja quanto às características nutricionais de proteína do farelo desengordurado. *Ciências Agrotecnológicas*, vol. 24, n. 4, p. 961-967.
- Harkness J.E. e Wagner, J.E. (1993) - *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. 3.ed. São Paulo: Roca, 238 p.
- Kato, T.; Takemoto, K.; Katayama H. e Kuwabara, Y. (1984) - Effects of *Spirulina platensis* on dietary hypercholesterolemia in rats. *J. Jap. Soc. Nutr. food Sci.*, vol. 37, n. 4, p. 323-332.
- Machado, D.F.; Ferreira, C.L.L.F.; Costa, N.M.B. e Oliveira, T.T. (2003) - Efeito de probiótico na modulação dos níveis de colesterol sérico e no peso do fígado de ratos alimentados com dieta rica em colesterol e ácido cólico. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, vol. 23, n. 2, p. 270-275.
- Malheiros, P.D.; Micheletto, Y.M.S., da Silveira, N.P. e Brandelli, A. (2010) - Development and characterization of phosphatidylcholine nanovesicles containing the antimicrobial peptide nisin. *Food Research International*, vol. 43, n. 4, p. 1198-1203
- Marco, P.L. (2008) - Avaliação da Biodisponibilidade de Nutrientes em Multimisturas acrescidas de *Spirulina platensis*. Rio Grande, 2008. Dissertação de Mestrado (Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande (Furg). 84 p.
- Melo S.S.; Silveira, B. M.; Stefanos, F. B.; Tomio, T. A. e Tischer, C. A. (2008) - Efeito da goma arábica nas concentrações de colesterol hepático, sérico e fecal de ratos alimentados com semente de linhaça, óleo de linhaça e colesterol sintético. *Alimentos e Nutrição*, vol. 19, n. 2, p. 133-144.
- Messias, J.B. (2009) - Parâmetros hematológicos de *Rattus norvegicus* obtidos através de método automatizado e não automatizado. *Medicina Veterinária*, vol. 3, n. 2, p.1 -8.
- Miller O. (1993) - *Laboratório para o clínico*. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Atheneu. 493p.
- Morais M.G. e Costa J.A.V. (2008) - Perfil de ácidos graxos de microalgas cultivadas com dióxido de carbono. *Ciência Agrotecnica de Lavras*, vol. 32, n. 34, p. 1245-1251.
- Moreira, L.M. (2010) - Efeito de diferentes concentrações de *Spirulina* nos perfis Bioquímico, Hematológico e Nutricional de Ratos Wistar Nutridos e desnutridos. Dissertação de Mestrado (Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Federal do Rio Grande (Furg), 119 p.
- Moreira, L.M.; Rocha, A.S.R., Ribeiro, C.L.G.; Rodrigues R.S. e Souza-Soares, L.A. (2011) - Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Spirulina platensis*. *African Journal of Food Science*, vol. 5, n.15, p. 799-805.
- 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.
- Parisi, A.S.; Younes, S. e Colla, L.M. (2009) - Assessment of the antibacterial activity of microalgae *Spirulina platensis*. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, vol. 30, n. 3, p. 97-301.
- Pulz, O. e Gross, W. (2004) - Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology Biotechnology*, vol. 65, n. 6, p.635-648.
- Reeves, P.G.; Nielsen, F.H. e Fahey, G.C.Jr. (1993) - AIN-93 purified diet of laboratory Rodents. Final report of the American Institute of Nutrition *ad hoc* writing Committee on the Reformulation of the AIN-76A Rodents Diet. *J. Nutr.*, vol. 123, n. 6, p. 1939-1951.
- Richmond, A. (2004) - *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Oxford: Blackwell Science. 566 p
- Rogatto, G.P.; Oliveira C.A.M.; Santos, J.W.; Machado, F.B.; Nakamura, F.Y.; Moraes, C.; Za-

- gatto, A.M.; Faria, M.C.; Afonso, M. e Mello, M.A.R. (2004) - Influência da ingestão de *Spirulina* sobre o metabolismo de ratos exercitados. *Rev. Bras. Med. Esportiva*, vol. 10, n. 4, p. 258-263.
- Sahoo, S. K.; Parveen S. e Panda, J.J. (2007) - The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, vol. 3, n. 1, p. 20-31.
- Santos, H.B.; Madruga, M.S.; Bion, F.M.; Marinho, N.L.; Antunes, K. e Mendes, R.A. (2004) - Estudos Bioquímicos e Hematológicos em Ratos sobre Biodisponibilidade de Minerais numa dieta enriquecida com multimistura. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol. 24, n. 4, p. 613-618.
- Sgarbieri, V. C. (1996)-Proteínas em Alimentos Protéicos: Propriedades – Degradação – Modificações. São Paulo: Varela, 517p.
- Souza, E.C.G.; Miranda, L.C.G.; Nagem, T.J.; Oliveira, T.T.; Costa, N.M.B.; Queiroz, M.E.L.R.; Neves, A.A. e Rezende, J.L.M. (2000) - Síntese e caracterização nutricional de plasteína obtida da proteína da folha de mandioca, da soja e do soro de queijo. *Revista Ceres*, vol. 47, n. 269, p. 9-20.
- Souza-Soares, L. A. DE; Machado M.R.G. e Rodrigues R.S. (2009) - Experimentação com Animais de laboratório, Manual básico. Pelotas: Editora Universitária/UFPEL, p. 468.
- Statistica (2004) - Statsoft (data analysis software system) version 7 for Windows. www.statsoft.com.
- Tranquille, N.; Emeis, J.J.; Chambure, D.; Binot, R. e Tamponnet, C. (1994) - *Spirulina* acceptability trials in rats. A study for the “Melissa” life-support system. *Adv. Space Res.*, vol. 14, n.11, p.167-170.
- Verruma-Bernardi, M.R.; Barros, C.S.; Dias, S.S.; Tonhati, H.; Guzmán-Silva, M.A.; Araújo, K.G.L. e Boaventura, G.T. (2009) - Efeito do consumo do queijo mozzarella de leite de búfala no perfil nutricional e sérico de ratos. *Alim. Nutr.*, vol. 20, n. 3, p. 457-462.
- Vaz, J.S.; Deboni, F.; Azevedo, J.; Gross, J.L. e Zelmanovitz, T. (2006) - Fatty acids as biological markers of fat intake. *Revista de Nutrição*. vol. 19, n. 4, p. 489-500.